

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Arylamin-*N*-Acetyltransferase 2

**- genetische Polymorphismen als
Suszeptibilitätsfaktoren für das Mammakarzinom?**

Eine Fall-Kontroll-Studie -

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Reinhard Wolf
aus Freiburg

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi

2. Prof. Dr. med. Uwe Fuhr

3. Prof. Dr. med. Kurt Possinger

Datum der Promotion: 12.06.03

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	5
1.1. Das Mammakarzinom	5
1.1.1. Ausgangspunkt der Untersuchung	5
1.1.2. Häufigkeit, Pathologie, Lokalisation	6
1.1.3. Ätiopathogenese	7
1.1.3.1. Familiäre Faktoren	8
1.1.3.2. Strahlenexposition	9
1.1.3.3. Fett- und Fleischgehalt in der Nahrung	10
1.1.3.4. Alkohol	11
1.1.3.5. Hormonelle Faktoren	12
1.1.3.6. Orale Kontrazeptiva und Östrogensubstitution	15
1.1.3.7. Benigne Brusterkrankungen	16
1.1.3.8. Genetische Disposition	16
1.1.3.9. Nikotinkonsum	18
1.2. Die Arylamin- <i>N</i> -Acetyltransferasen (NAT)	19
1.2.1. Bedeutung im Fremdstoffwechsel	19
1.2.2. Genetik der NAT	20
1.2.3. Mutationen und Haplotypen am NAT2-Locus	21
1.3. Der Acetyliererstatus als möglicher Suszeptibilitätsfaktor für das Mammakarzinom und andere Karzinome	24
1.4. Klinisch wissenschaftliche Fragestellung	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Patientenkollektiv	28
2.2. Kontrollkollektiv	32
2.3. Material	33
2.4. Methoden	36
2.4.1. DNA-Isolierung	36
2.4.2. Genotypisierung der NAT2-Mutationen	37
2.5. Statistik	45
2.6. Ethische Grundlagen und Datenschutz	45

3.	Ergebnisse	46
3.1.	Genotypisierung der Arylamin- <i>N</i> -Acetyltransferase 2 bei Mammakarzinomen und bei Kontrollen	46
3.2.	Stratifizierung nach dem Alter	49
3.3.	Stratifizierung nach dem Ausmass des Zigarettenkonsums	49
3.4.	Stratifizierung nach Blutgruppenmerkmalen	50
3.5.	Stratifizierung innerhalb des Mammakarzinomkollektivs	52
3.5.1.	Menopause	52
3.5.2.	Menstruationsdauer	52
3.5.3.	TNM-Klassifikation	53
3.5.4.	Grading	53
3.5.5.	Tumorphistologie	54
3.5.6.	Hormonrezeptorstatus	54
4.	Diskussion	56
4.1.	Verteilung der Acetylierergenotypen bei Mammakarzinompatientinnen in Abhängigkeit von individuellen Bedingungen	56
4.2.	Assoziationen des <i>NAT2</i> -Genotyps mit der Tumorphistologie beim Mammakarzinom	58
4.3.	Assoziationen des <i>NAT2</i> -Genotyps mit dem Hormonrezeptorstatus bei Mammakarzinomen	59
4.4.	Assoziation des schnellen <i>NAT2</i> -Genotyps mit Zigarettenkonsum	60
4.5.	Stratifizierung innerhalb des Mammakarzinomkollektivs	63
4.6.	Toxifizierung von Fremdstoffen zu Karzinogenen in der Ätiopathogenese des Mammakarzinoms	63
5.	Zusammenfassung	67
	Literaturverzeichnis	69
	Danksagung	87
	Lebenslauf	88
	Eidesstattliche Erklärung	89

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

1.1.1. Ausgangspunkt der Untersuchung

Für die Pathogenese des Mammakarzinoms, dem häufigsten Tumor der Frau, scheinen genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Hierzu rechnet man seltene aber hochpenetrante genetische Mutationen wie das BRCA1-Gen (Chromosom 17q21), das weniger stark mit dem Risiko eines Mammakarzinoms korrelierende BRCA2-Gen (13q) und darüberhinaus Amplifikationen des c-myc-Protoonkogens sowie ein Heterozygotitätsverlust von Genen auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 in der Region 3p21-p25 (Schmoll *et al.*, 1999).

Darüberhinaus ist zwischen dem genetisch determinierten Acetyliererstatus und dem Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen sowie dem erhöhten Risiko, an malignen Tumoren zu erkranken, seit langem ein Zusammenhang bekannt (Evans, 1992). Der Metabolisierungsschritt der *N*-Acetylierung spielt eine wichtige Rolle in der Bio-transformation verschiedener Medikamente, Präkanzerogene und anderer Fremdstoffe mit Arylamin- oder Hydralazinstruktur.

Für bestimmte Karzinome wurde eine Beziehung zwischen Schadstoffexposition und Polymorphismen von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen nachgewiesen.

Xenobiotika zählen zu den wichtigsten Substraten der Arylamin-*N*-Acetyltransferasen. Erbliche Unterschiede in den Aktivitäten der Fremdstoff-metabolisierenden Arylamin-*N*-Acetyltransferasen NAT1 und NAT2 können zu unterschiedlichen Aktivierungen und Detoxifizierungen von Arylaminen, die im Zigarettenrauch oder zubereitetem Fleisch enthalten sind, führen und direkt zur Bildung von DNA-Addukten beitragen (Hein *et al.* 1993).

Dies bedeutet, dass der Polymorphismus der NAT2-Gene die Suszeptibilität gegenüber Effekten z. B. des Zigarettenrauchens beeinflussen kann. Der genetisch determinierte Acetyliererstatus könnte die Pathogenese des Mammakarzinoms prägen.

Vorliegende Studie soll die Assoziation zwischen dem Mammakarzinom und dem Acetyliererstatus prüfen.

1.1.2. Häufigkeit, Pathologie, Lokalisation

Das Mammakarzinom stellt mit etwa 23% aller malignen Erkrankungen den häufigsten Tumor der Frau dar. In der westlichen Welt erkrankt derzeit jede 8. bis 10. Frau an diesem Tumor. Für Frauen in den westlichen Ländern beträgt die kumulative Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs im Verlauf des Lebens zu erkranken, 5 – 12% (Schmoll *et al.*, 1999).

In Deutschland treten jährlich ca. 43.000 Neuerkrankungen des Mammakarzinoms auf. Inzidenzunterschiede sind auffallend: in Nord- und Westeuropa werden 70 bis 110 Erkrankungen pro 100.000, in Süd- und Osteuropa 25 bis 40 Erkrankungen pro 100.000 Frauen beobachtet. Die Mortalität beträgt 15 pro 100.000 Frauen in Südeuropa, und 29 pro 100.000 Frauen in Nordeuropa. (Schmoll *et al.*, 1999).

Epidemiologisch findet sich darüberhinaus weltweit eine erhebliche Variationsbreite der Inzidenzraten. Mammakarzinome werden in Nordamerika und in Nord- und Mitteleuropa etwa fünfmal häufiger beobachtet als in Asien und Südamerika (Schmoll *et al.*, 1999).

Daten des „Surveillance, Epidemiology, and End Results“ (SEER) Programms zeigten auf, dass weishäutige US-amerikanische Frauen ein Risiko von 13,1% besitzen, eine Brustkrebserkrankung im Laufe ihres Lebens zu entwickeln, im Unterschied zu amerikanischen Frauen afrikanischer Herkunft, bei denen dieses Risiko 9,6% beträgt. Dabei beträgt das Mortalitätsrisiko gleichermassen 3,4% sowohl für weisse US-amerikanische Frauen als auch für amerikanische Frauen afrikanischer Herkunft (Ries *et al.* 1999).

Die Inzidenz des Mammakarzinoms hat in den letzten Jahren stetig zugenommen. Wahrscheinlich, wenngleich nicht gesichert, sind Änderungen der Risikoprofile ausschlaggebend. Dies bedeutet einmal eine insgesamt verlängerte Menstruationsdauer mit früherem Beginn der Menarche und späterem Einsetzen der Menopause, zum anderen eine geringere Anzahl und erst zunehmend häufiger im späteren Lebensalter ausgetragene Schwangerschaften. Schliesslich sind veränderte Lebens- und Essgewohnheiten massgeblich (Schmoll *et al.*, 1999).

Trotz zunehmender Inzidenz wurde dagegen in den USA und in Grossbritannien seit 1990 eine deutliche Abnahme der Mortalität festgestellt (Levi *et al.* 1995). So nahm die Brustkrebsmortalität in den USA von 1991 bis 1995 um 5,3% ab (Hoecksema *et al.* 1996). Als Gründe für diese Entwicklung sind zu nennen: vermehrtes Gesundheitsbewusstsein, eine zunehmende Akzeptanz von Mammographien und damit verbunden häufigere Frühdiagnosen und der konsequente Einsatz adjuvanter Therapiemassnahmen.

Bermerkwert ist, dass die Anzahl von In-situ-Karzinomen, insbesondere der duktalen Karzinome in situ (DCIS) ansteigend ist. Demgegenüber hat die Inzidenz invasiver Mammakarzinome ein Plateau erreicht. Die Daten des „SEER-Programms“ ergaben einen Zuwachs von 130% der In-situ-Karzinome bei weissen US-amerikanischen Frauen und eine Zunahme von 190% bei US-amerikanischen Frauen afrikanischer Herkunft in den Jahren zwischen 1983 und 1996 (Ries *et al.* 1999).

Man nimmt an, dass im Jahre 1999 bei nahezu 40.000 Frauen in den Vereinigten Staaten In-situ-Karzinome diagnostiziert wurden. Diese Zunahme von In-situ-Karzinomen, insbesondere der DCIS, ist in erster Linie als Ergebnis eines immer häufigeren Gebrauchs des Mammographiescreenings anzusehen (De Vita, 2001).

Der Erkrankungsgipfel des Mammakarzinoms bei der Frau wird zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr erreicht.

1.1.3. Ätiopathogenese

Bei der Karzinogenese des Mammakarzinoms wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Zu den ätiologisch bedeutsamen Faktoren werden zunehmendes Alter, familiäre Belastung, die Exposition gegenüber endogenen und exogenen weiblichen Hormonen, diätetische Faktoren, benigne Brusterkrankungen und belastende Faktoren aus der Umgebung gezählt (De Vita, 2001).

Bezogen auf den Individualfall bedeutet die überwiegende Mehrheit dieser Faktoren eine geringe bis moderate Risikoerhöhung. Man nimmt an, dass nahezu 50% der Frauen, die eine Brustkrebserkrankung entwickeln, fortgeschrittenes Alter und weibliches Geschlecht ausgenommen, keine erkennbaren Risikofaktoren für ein Mammakarzinom besitzen (Madigan *et al.* 1995).

Da das Mammakarzinom überwiegend eine Krebserkrankung der Frauen darstellt, wird das weibliche Geschlecht oft nicht als eigenständiger Risikofaktor hervorgehoben. Ebenso wird die Bedeutung des Alters gelegentlich übersehen. Besonders jüngere Frauen überschätzen ihr potentiell Risiko, ein Mammakarzinom entwickeln zu können (Philips *et al.*, 1999).

Nach den Daten des „SEER-Programms“ tritt das Mammakarzinom bei Frauen unter 30 Jahren nur aussergewöhnlich selten auf. Beispielweise betrug die Inzidenz des Mammakarzinoms in der Zeit von 1992 bis 1996 bei der Gruppe von Frauen im Alter zwischen 35 bis 39 Jahren 59 pro 100.000 Frauen im Vergleich zu der Gruppe von Frauen im Alter zwischen 55 bis 59 Jahren, bei der das Mammakarzinom mit einer Inzidenz von 296 pro 100.000 Frauen auftrat. Die jährliche Inzidenz ist zunehmend, wenngleich weniger ausgeprägt, wenn Frauen ein Alter von 60 Jahren und 70 Jahren erreichen (Ries *et al.*, 1999).

1.1.3.1. Familiäre Faktoren

Ogleich familiäre Faktoren über eine lange Zeit als ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung des Mammakarzinoms erachtet wurde, muss gleichwohl festgestellt werden, dass die Mehrheit der Mammakarzinompatientinnen ohne Familienangehörige mit einer Brustkrebserkrankung ist. Lediglich bei 5 bis 10% der an Brustkrebs erkrankten Patientinnen ist eine genetische Prädisposition für ein Mammakarzinom nachweisbar (Claus *et al.* 1996).

Dies bedeutet, dass viele Frauen mit einer positiven Familienanamnese ihr persönliches Risiko, ein Mammakarzinom zu entwickeln, überschätzen (Lerman *et al.* 1995). Ebenso überschätzen viele Frauen, die sich einem genetischen Test unterziehen, ihre Möglichkeit, den positiven Nachweis einer Mutation zu haben (Bluman *et al.* 1999).

Insgesamt ist das Brustkrebsrisiko bei Frauen, deren Mutter oder Schwester an einem Mammakarzinom leidet, allenfalls auf das 1,5- bis 3,0-fache gegenüber Frauen mit einer diesbezüglich leeren Familienanamnese erhöht (Ottman *et al.* 1983; Anderson *et al.* 1974).

Eine positive Familienanamnese stellt einen heterogenen Risikofaktor dar, dessen Bedeutung von der Anzahl der Angehörigen mit Brustkrebs abhängig ist, vom Grad der Verwandtschaft, vom Alter, in dem Angehörige an Brustkrebs erkrankten und schliesslich von der Anzahl der von der Brustkrebserkrankung nicht betroffenen Angehörigen. Dies bedeutet, dass von einer nur als minimal zu bezeichnenden Risikoerhöhung bei denjenigen Frauen auszugehen ist, bei denen unter den Angehörigen z. B. nur die Mutter an einem Mammakarzinom erkrankte, und die Mutter darüberhinaus von dieser Tumorerkrankung erst im fortgeschrittenen Alter betroffen wurde (De Vita, 2001).

Dagegen ist eine Frau mit mehreren an einem prämenopausalen Mammakarzinom erkrankten Verwandten durch die Möglichkeit eines Brustkrebses ungleich stärker gefährdet (Claus *et al.* 1996).

1.1.3.2. Strahlenexposition

Eine Strahlenexposition (Atombombenbexplosion in Hiroshima und Nagasaki, medizinische Diagnostik, Strahlentherapie) korreliert eng mit der Inzidenz des Mammakarzinoms (Tokunada *et al.* 1987; Hildreth *et al.* 1989). Hierbei besteht ein Strahlen-Dosis-Effekt für die Induktion eines Mammakarzinoms nach einer Latenzzeit von ca. 20 Jahren. Frauen, die wegen Lungentuberkulose häufig durchleuchtet wurden oder wegen maligner Erkrankungen (Thymom, Morbus Hodgkin) eine Strahlentherapie erhielten, entwickelten in der Folgezeit signifikant häufiger Mammakarzinome als nicht strahlen-exponierte Frauen (Hancock *et al.* 1993).

Daneben ist das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Exposition ausschlaggebend: Bei Frauen, die im Jahr der Atombombenexplosion in Hiroshima und Nagasaki 10-14 Jahre alt waren, wurde die höchste Inzidenz der Entwicklung eines Mammakar-

zinoms beobachtet. Dagegen wurde bei Frauen, die zum Zeitpunkt der Explosion 30-49 Jahre alt waren, kein erhöhtes Risiko eines Mammakarzinoms festgestellt (De Vita, 2001).

Generell stellt die Strahlenexposition in früher Adolozsenz ein hohes Karzinomrisiko dar, bei dem ein lineares Dosis-Response-Risiko für die Entwicklung eines konsekutiven Mammakarzinoms unterstellt werden kann (Tokunada *et al.* 1987).

Desweiteren werden andere Umgebungsfaktoren diskutiert, die im Verdacht stehen, das Brustkrebsrisiko zu erhöhen. Hierzu werden die Exposition gegenüber elektromagnetischen Feldern oder gegenüber organischen Pestiziden gerechnet. Eine abschliessende Bewertung dieser möglichen Risikofaktoren steht derzeit allerdings aus (De Vita, 2001).

1.1.3.3. Fett- und Fleischgehalt in der Nahrung

Eine mögliche Relation zwischen Brustkrebs und Nahrungsverhalten wurde angesichts der grossen Variabilität der Inzidenzraten des Mammakarzinoms weltweit vermutet. Studien über Emigranten zeigten, dass diese Unterschiede nicht allein Folge genetischer Faktoren sind (Buell *et al.* 1973; McMichael *et al.* 1988). In die USA emigrierte japanische Frauen und in der ersten Generation geborene Frauen von emigrierten japanischen Frauen wiesen etwa die gleiche Inzidenzrate an Mammakarzinomen auf wie weisse US-Amerikanerinnen aus der entsprechenden Region. Diese Inzidenzraten liegen signifikant höher als die japanischer Frauen (Buell *et al.* 1973).

Nach epidemiologischen Studien besteht in den westlichen Industriegesellschaften derzeit kein Anhalt für eine sichere Assoziation zwischen Brustkrebsrisiko und unterschiedlichem Fettgehalt in der Nahrung Erwachsener. (Philips *et al.* 1980; Kinlen *et al.* 1982; Willet *et al.* 1987; Hunter *et al.* 1996; Ambrosone *et al.* 1998; Holmes *et al.* 1999; De Vita, 2001).

Untersuchungen im Hinblick auf eine Assoziation zwischen Energiebilanz und Brustkrebsrisiko waren dagegen aufschlussreicher. Übergewicht im jungen Erwachsenenalter ist mit einer niedrigeren Inzidenz des prämenopausalen Mammakarzinoms verknüpft (Rich-Edwards *et al.* 1994; Huang *et al.* 1997). Dagegen stellt die Gewichtszunahme jenseits des achtzehnten Lebensjahres ein signifikant erhöhtes Risiko für ein postmenopausales Mammakarzinom dar (Huang *et al.* 1997; Ziegler *et al.* 1996).

Die protektive Wirkung des jugendlichen Übergewichts wird durch den Hinweis auf die bei diesen Frauen häufiger zu beobachtenden irregulären Ovarialzyklen mit der Folge niedrigerer Östrogenkonzentrationen gedeutet (Hankinson *et al.* 1994). Das gesteigerte Brustkrebsrisiko durch Gewichtszunahme im späteren Erwachsenenalter wurde durch erhöhte Östrogenspiegel als Folge einer verstärkten Östrogenproduktion im Fettgewebe erklärt (Huang *et al.* 1997).

Hormonelle Faktoren beeinflussen wahrscheinlich auch den günstigen Einfluss körperlicher Aktivität auf das Brustkrebsrisiko. Körperliche Aktivität bei jungen Frauen reduziert das Brustkrebsrisiko durch eine verspätete Menarche und eine verminderte Zahl von Ovulationszyklen (Thune *et al.* 1997; Rockhill *et al.* 1999).

1.1.3.4. Alkohol

Mehrere Studien lassen einen Zusammenhang zwischen Einnahmemenge von Alkohol und Brustkrebsrisiko vermuten. Nach den Befunden einer Meta-Analyse (Longnecker *et al.* 1992), die 12 Fall-Kontroll-Studien auswertete, vermag ein moderater Alkoholkonsum das Brustkrebsrisiko zu erhöhen (relatives Risiko zwischen 1,1 bei einem Konsum von 12g Alkohol pro Tag und 1,4 bei einem Konsum von 36 g Alkohol pro Tag).

Zusätzliche Daten aus prospektiven Studien bestätigen ein erhöhtes Risiko durch höhere Alkoholmengen (Garfinkel *et al.* 1988; Capstur *et al.* 1992; Friedenreich *et al.* 1993).

1.1.3.5. Hormonelle Faktoren

Das Mammakarzinom korreliert eindeutig mit dem Einfluss durch weibliche Hormone. Verschiedene Studien haben die Inzidenz des Mammakarzinoms mit dem Alter der Menarche, der Menopause und dem Zeitpunkt der ersten Schwangerschaft in Verbindung gebracht. Der Altersgipfel des Brustkrebses liegt in der Menopause (De Vita, 2001).

Allgemein wird angenommen, dass die Gesamtheit der Jahre, in denen Frauen durch einen regelmässigen ovariellen Zyklus endogenen Östrogenspiegeln ausgesetzt sind, für die Entstehung eines Mammakarzinoms bedeutsam ist. Danach erhöht eine frühe Menarche, gefolgt von einer späten Menopause, das Karzinomrisiko. Mit jedem Jahr, durch das die Menarche später eintritt, verringert sich die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Mammakarzinoms um 20% (Mac Mahon *et al.* 1973; Kelsey *et al.* 1993).

Bei postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen sind Adipositas (Huang *et al.* 1997) und eine postmenopausal durchgeführte Hormontherapie (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997) mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert, da Adipositas und eine postmenopausal durchgeführte Hormontherapie positiv mit den Plasma-Östrogen- und Plasma-Östradiolspiegeln korrelieren.

Das Alter zum Zeitpunkt der Menopause spielt eine wichtige Rolle als Risikofaktor für ein Mammakarzinom. Das relative Risiko einer Frau mit einer natürlichen Menopause vor dem 45. Lebensjahr ist halb so gross wie das nach dem 55. Lebensjahr (Trichopoulos *et al.* 1972).

Die Alters-spezifische Inzidenz des Mammakarzinoms nimmt stufenweise mit dem Alter der Frauen bis zur Menopause zu. Nach der Menopause steigt zwar die Inzidenz weiterhin, jedoch sehr viel langsamer, d.h. nur etwa ein-sechstel so rasch im Verhältnis zur Inzidenzzunahme während der Prämenopause. Diese auffällige Verlangsamung der Inzidenzzunahme in der Zeit nach der Menopause lässt vermuten, dass die Aktivität der Ovarien von ausschlaggebender Bedeutung für die Ätiologie des Mammakarzinoms ist (De Vita, 2001).

Es besteht Gewissheit, dass die Unterdrückung der Östrogenproduktion durch eine iatrogen herbeigeführte vorzeitige Menopause das Brustkrebsrisiko reduziert. Nach den Ergebnissen epidemiologischer Studien weisen Frauen, die sich in der Prämenopause einer Ovariectomie unterziehen, und die postoperativ keine Hormonersatztherapie erhalten, in ihrem späteren Leben ein signifikant herabgesetztes Brustkrebsrisiko auf. Eine Ovariectomie vor dem 50. Lebensjahr reduziert das Brustkrebsrisiko. Dies ist von grösserer Bedeutung als das Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Ovariectomie (Helzlsouer *et al.* 1995).

Brustkrebserkrankte Frauen, die sich im Zusammenhang mit einer adjuvanten Therapiemassnahme einer Ovariectomie unterzogen, erlitten weniger häufiger ein Rezidiv durch Befall der kontralateralen Mamma als Mammakarzinompatientinnen, die nicht ovariectomiert wurden (Nissen-Meyer *et al.* 1991).

Nach den 1999 durch Rebbeck *et al.* veröffentlichten Daten ist zu vermuten, dass Frauen mit BRCA1-Mutationen von der protektiven Wirkung einer prophylaktischen Ovariectomie grundsätzlich profitieren können.

Schwangerschaft und Alter bei der ersten Geburt stellen weitere Faktoren dar, die das Brustkrebsrisiko beeinflussen: Die Auswirkung einer ausgetragenen Schwangerschaft auf das Brustkrebsrisiko variiert mit dem Alter bei der ersten Geburt. Frauen mit der ersten Geburt in einem Alter über 30 Jahre besitzen ein 2-5-fach erhöhtes Brustkrebsrisiko gegenüber Frauen mit der ersten Geburt in einem Alter von 18 oder 19 Jahren (Mac Mahon *et al.* 1970; Brinton *et al.* 1983; Trichopoulos *et al.* 1983).

Kinderlose Frauen besitzen ein um 1,4-fach erhöhtes relatives Risiko für ein Mammakarzinom im Vergleich mit Frauen, die Kinder geboren haben (Mac Mahon *et al.* 1970).

Diese offensichtlich gegensätzlichen Effekte der Schwangerschaft auf das Risiko eines Mammakarzinoms fanden unterschiedliche Erklärungsversuche Brustkrebses:

- 1) Es erscheint möglich, dass unter dem Einfluss hormoneller Veränderungen bei ausgetragener Schwangerschaft das ausgereifte Brustdrüsengewebe weniger anfällig für eine maligne Transformation ist
- 2) Die auf Dauer alterierten Hormonspiegel nach einer ausgetragenen Schwangerschaft verändern möglicherweise die Proliferationsrate des Brustdrüsengewebes.
- 3) Bei einer inkompletten Schwangerschaft ist das Brustdrüsengewebe allein den hohen Östrogenspiegeln der frühen Episode einer Schwangerschaft ausgesetzt. Dies kann für diese Frauen einen erhöhten Risikofaktor für ein Mammakarzinom darstellen (Molgavkar *et al.* 1989).

Untersuchungen zu Auswirkungen der Laktation auf das Mammakarzinom ergaben unterschiedliche Resultate. Zuletzt erschienene Studien legen die Vermutung nahe, dass eine lange Dauer der Laktation das Brustkrebsrisiko bei prämenopausalen Frauen herabsetzt (Yuan *et al.* 1988, Newcomb *et al.* 1994).

Der potentiell protektive Effekt der Laktation auf das Brustkrebsrisiko ist möglicherweise als eine Folge der vollständigen Zelldifferenzierung aufzufassen, die durch hormonelle Veränderungen nach einer ausgetragenen Schwangerschaft eintritt, und die eine maligne Transformation dieser ausdifferenzierten Zellen des Brustdrüsengewebes weit weniger wahrscheinlich macht.

Der spontane oder gewollte Abbruch einer Schwangerschaft scheint nach verschiedenen Untersuchern den protektiven Effekt der Schwangerschaft zu schmälern, das heisst, das Risiko einer Entwicklung eines Brustkrebses zu erhöhen (Pike *et al.* 1983; Hadjimichael *et al.* 1986; Howe *et al.* 1989; Prind *et al.* 1996).

Andere Studien zeigten dagegen keine Risikoerhöhung durch einen Schwangerschaftsabbruch auf (Rosenberg *et al.* 1988; Adami *et al.* 1990; Newcomb *et al.* 1996). Eine von Melbye *et al.* 1997 durchgeführte grosse Kohorten-Studie, die 1,5 Mill. dänische Frauen umfasste, ergab ebenfalls keinen Nachweis eines erhöhten Langzeitrisikos für die Entstehung eines Mammakarzinoms bei Frauen, deren Schwangerschaft frühzeitig unterbrochen wurde.

1.1.3.6. Orale Kontrazeptiva und Östrogensubstitution

Die Auswirkungen einer Hormonersatztherapie und oral-applizierter Kontrazeptiva auf das Brustkrebsrisiko wurden extensiv untersucht. Insgesamt betrachtet ist es ungewiss, ob das Brustkrebsrisiko bei Frauen, die oral applizierte Kontrazeptiva eingenommen haben, signifikant erhöht ist (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997; Hankinson *et al.* 1997).

Metaanalysen des Effektes einer Hormonersatz-Therapie weisen einen kleinen, statistisch aber signifikanten Zuwachs des relativen Risikos von 1,02 bis 1,35 (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997; Steinberg *et al.* 1985; Silero-Arenas *et al.* 1992) nach. Das Risiko nimmt mit der Dauer der Verwendung zu. Diese Befunde stimmen mit Studienergebnissen überein, die zeigen, dass postmenopausale Frauen mit höheren Östrogen-Konzentrationen im Serum einem grösseren Risiko für ein Mammakarzinom ausgesetzt sind als Frauen mit niedrigen Östrogen-Konzentrationen (Hankinson *et al.* 1998; Cauley *et al.* 1999).

Das erhöhte Karzinomrisiko besteht nur für die Zeit der aktuellen Östrogensubstitution und sinkt nach Beendigung der Hormonersatztherapie wieder ab. Pro Jahr der Östrogenerstaztbehandlung steigt das Brustkrebsrisiko um 4% und liegt nach 10-jähriger Einnahme bei 46%. Fünf Jahre nach Beendigung der Hormontherapie ist das Mammakarzinomrisiko als nicht mehr erhöht anzusehen (Capstur *et al.* 1999).

Studien neueren Datums weisen auf einen statistisch signifikanten Zuwachs des Mammakarzinomrisikos bei Frauen hin, die Hormonkombinationspräparate einnehmen (Östrogen- plus Progesteronkomponente) im Unterschied zu Frauen, die für die Hormonersatztherapie nur reine Östrogenpräparate verwenden (Schairer *et al.* 2000; Ross *et al.* 2000).

Vermutlich weisen Mammakarzinome, die infolge einer Hormonersatztherapie entstanden sind, eine prognostisch günstigere Tumor-Histologie auf (Salmon *et al.* 1999; Capstur *et al.* 1999).

1.1.3.7. Benigne Brusterkrankungen

Unter den benignen Brusterkrankungen sind die proliferativen Formen ohne atypische Hyperplasie im Unterschied zu den nicht-proliferativen Formen durch eine gering erhöhte maligne Entartungsrate (relatives Risiko: 1,5 bis 2,0) belastet. Dagegen gehen proliferative Brusterkrankungen mit atypischer Hyperplasie mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einher (relatives Risiko: 4,0 bis 5,0) (Dupont *et al.* 1985).

Frauen mit Nachweis einer atypischen Hyperplasie und familiärer Mammakarzinombelastung durch Angehörige I° sind einem 11-mal höheren Brustkrebsrisiko ausgesetzt als Frauen mit einer nicht-proliferativen Brustkrebserkrankung. Umgekehrt werden proliferative Brusterkrankungen häufiger bei Frauen mit familiärer Mammakarzinombelastung diagnostiziert. Dagegen wurde beobachtet, dass das Brustkrebsrisiko bei Frauen mit einer proliferativen Brusterkrankung, die nach der Gewebebiopsie der Brust Östrogen-Präparate einnahmen, nicht erhöht ist (Dupont *et al.* 1999).

Nach Untersuchungen der „Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer“ (1997) können keine übereinstimmenden Ergebnisse zu Subgruppen von Patientinnen mit einer benignen Brusterkrankung gefunden werden.

1.1.3.8. Genetische Disposition

Eine genetisch fixierte Prädisposition ist bei etwa 5-10% aller Frauen mit Brustkrebs anzunehmen. Wie bei vielen anderen malignen Erkrankungen wurden auch beim Mammakarzinom Dysfunktionen und Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gefunden, die an der Entstehung, Entwicklung und/oder Propagation zumindest eines Teils der Mammakarzinome beteiligt sind. Von den Onkogenen sind in bezug auf das Mammakarzinom Amplifikationen des HER-2/ neu (Synonyme: c-erbB-2, p185) und des Epidermal-Groth-Factor-Rezeptor (EGFR; Synonym: erbB-1) -Gens und von den Tumorsuppressorgenen Mutationen von p53, BRCA-1, BRCA-2, AT (Ataxia telangiectasia) und pTEN/ MMAC1 relevant (Schmoll *et al.* 1999).

Nach heutigem Wissen scheint das BRCA-1-Gen, das auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q21) lokalisiert ist, und das aus 24 Exons besteht, für das Auftreten von sporadischem, also nicht familiären Brustkrebs keine Rolle zu spielen. Das BRCA-2-Gen ist auf dem Chromosom 13 (13q12-13) lokalisiert. Keimbahnmutationen im p53-Gen (17q13) prädisponieren Trägerinnen zu den mit multiplen Neoplasien einhergehenden Li-Fraumeni-Syndrom. Eine weitaus grössere Rolle spielt das p53-Gen bei den sporadisch auftretenden Mammakarzinomen, bei denen in bis zu 50% der Fälle p53-Mutationen gefunden werden (Schmoll *et al.*, 1999).

Liegen Mutationen des BRCA-1- oder des BRCA-2-Gens vor, besitzen die Trägerinnen dieser Mutationen ein 56%-iges Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms innerhalb von 75 Jahren (Healey u. Couch, 1997). Früher veröffentlichte Daten, durch die das Risiko auf 85% geschätzt wurde, lassen sich durch die Tatsache erklären, dass nur Hochrisikofamilien berücksichtigt wurden. Bei über der Hälfte der Trägerinnen von mutierten BRCA-Genen wird das Mammakarzinom vor dem 50. Lebensjahr klinisch manifest. Gleichzeitig besteht für diese Patientinnen ein erhöhtes Risiko, an einem Ovarial- oder Kolonkarzinom zu erkranken (Schmoll *et al.*, 1999).

Pathogenetische Relevanz besitzen ebenso Amplifikationen des c-myc-Protoonkogens sowie ein Heterozygotitätsverlust von Genen auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 in der Region 3p21-p25.

Die klinische Relevanz genetisch fixierter Risikofaktoren manifestiert sich augenfällig in sog. „Tumorfamilien“, in denen mehrere Verwandte ersten Grades über mehrere Generationen an Brustkrebs erkranken. Die Karzinome treten gehäuft bei jungen Frauen und gehäuft doppelseitig auf (Schmoll *et al.*, 1999).

1.1.3.9. Nikotinkonsum

Zigarettenrauchen ist eine wichtige Quelle exogen induzierter Karzinogene. Der NAT2-Polymorphismus könnte die individuelle Suszeptibilität für das Mammakarzinom bei Frauen, die rauchen, erhöhen, da aromatische Amine, die ein wesentliches Substrat der NAT2 darstellen, im Zigarettenrauch enthalten sind. Arylamine werden durch die polymorphe NAT2 acetyliert. Nach weiterer Biotransformation entstehen Azetoxyster, die in reaktive Arylnitreniumionen zerfallen. Arylnitreniumionen können mit DNA-Molekülen interagieren und Addukte bilden. Zigarettenrauchen stellt für Aktiv- und Passivraucher grundsätzlich ein Krebsrisiko dar.

Die meisten epidemiologischen Studien haben bislang keine eindeutige Assoziation zwischen Zigarettenrauchen und Brustkrebsrisiko gefunden (Doll *et al.* 1980; Baron *et al.* 1986; Adami *et al.* 1988; Hiatt *et al.* 1988; London *et al.* 1989; Schechter *et al.* 1989; Schatzkin *et al.* 1989; Ewartz *et al.* 1990; Vatten *et al.* 1990; Field *et al.* 1992).

Einige Studien berichten von einem erhöhten Risiko (Brinton *et al.* 1986; Hiatt *et al.* 1986; Stockwell *et al.* 1987; Brownson *et al.* 1988; Meara *et al.* 1989; Rohan *et al.* 1989; Chu *et al.* 1990; Palmer *et al.* 1991; Morabia *et al.* 1996), andere von einem herabgesetzten Risiko (Salber *et al.* 1969; Vessey *et al.* 1983; O'Connel *et al.* 1987).

In diesen Studien war die genetische Variabilität als Faktor der Suszeptibilität für die im Zigarettenrauch enthaltenen Karzinogene jedoch nicht berücksichtigt worden. Inwieweit vererbliche Polymorphismen des Acetyliererstatus (NAT2-Genotyp) die Suszeptibilität für die Entwicklung eines Mammakarzinoms modulieren können, wird derzeit unterschiedlich diskutiert (Ambrosone *et al.* 1996; Hunter *et al.* 1997; Millikan *et al.* 1998).

1.2. Die Arylamin-*N*-Acetyltransferasen (NAT)

1.2.1. Bedeutung im Fremdstoffwechsel

Die Acetylierung stellt einen wichtigen Metabolisierungsschritt des menschlichen Organismus für Fremdstoffe mit Arylamin- und Hydralazinstruktur dar (Grant *et al.* 1992).

Grundsätzlich lassen sich die molekularen Mechanismen der Biotransformation endogener Substrate und exogener Substrate (Xenobiotika) in Phase-I- und in Phase-II-Reaktionen einteilen.

Die Phase-I-Reaktionen schliessen alle Reaktionen ein, durch die das unpolare (nicht-ionische) Substrat zu einem polaren Metaboliten durch Oxidation, Reduktion, Hydrolyse oder Isomerisierung überführt wird. Das wichtigste Enzymsystem der ersten oxidativen und reduktiven Phase der Biotransformation stellt das Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenase-System dar.

Die Phase-II-Reaktionen umfassen sämtliche Reaktionen, in welchen die entstandenen Metabolite durch Glukuronidierung, Glykosilierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung oder Konjugationen mit Aminosäuren, Gluthation und Fettsäuren in hochpolare Konjugate transformiert werden, die renal oder biliär ausgeschieden werden können (Greiling, Gressner; 1995).

Neben der Gluthation-S-Transferase und der UDP-Glukuronyl-Transferase stellt die Arylamin-*N*-Acetyltransferase (NAT) ein wichtiges Enzymsystem der Phase-II-Reaktionen dar. Die biochemische Funktion der NAT besteht darin, eine Konjugatbildung mit einem Essigsäurerest zu ermöglichen, der durch das Acetyl-Coenzym-A übertragen wird.

Die Acetylierung kann entweder zur Entgiftung oder zur Toxifikation von Substanzen führen. Präkarzinogene, die im Zigarettenrauch enthalten sind oder im zubereiteten Fleisch entstehen, können durch O-Acetylierung zu ultimativen Karzinogenen umgewandelt werden.

Die Acetylierungsreaktion wird von zwei Enzymen, NAT1 und NAT2, katalysiert. Beide Enzyme unterscheiden sich in ihrer Gewebespezifität und in ihrer Substratspezifität. Die NAT1 kommt ubiquitär in vielen Geweben vor, die NAT2 wird vorwiegend in der Leber und im Colon nachgewiesen (Grant *et al.* 1990; Hein *et al.* 1993).

Von der NAT1 werden selektiv die Substrate wie die Arylamine p-Aminobenzoessäure (PABA) und p-Aminosalicylsäure (PAS) konjugiert. Einige Arylamine wie die 2-Amino-fluorene und Benzidine werden von beiden Enzymen gleichermassen verstoffwechselt (Grant *et al.*, 1992).

Die NAT2 zeigt eine stärkere Affinität zu Verbindungen wie Koffein, Sulfamethazin, Procainamid, Dihydralazin, Isoniazid, Nitrazepam und anderen als Arzneimitteln eingesetzten Substanzen (Evans, 1992). Auch die im Zigarettenrauch enthaltenen Arylamine werden von der NAT2 metabolisiert.

1.2.2. Genetik der NAT

Seit längerem ist ein erblicher Polymorphismus bekannt, der für die Ausbildung unterschiedlicher Aktivitäten des Enzyms verantwortlich ist. Dieser Umstand erklärt das grosse Interesse an der NAT2. Man unterscheidet phänotypisch schnelle und langsame Acetylierer.

1990 wiesen Blum *et al.* das Vorhandensein dreier *NAT*-Gene nach: das *NAT1*-Gen, das die damals so bezeichnete monomorphe *N*-Acetyltransferase kodiert, das *NAT2*-Gen, das für die polymorphe *N*-Acetyltransferase kodiert, und das Pseudogen *NATP*, das kein funktionierendes Protein kodiert.

Die Länge der proteinkodierenden Abschnitte auf dem *NAT1*- und *NAT2*-Gen beträgt jeweils 870 Basenpaare. Die Nukleotidsequenz beider Gene stimmt zu 87% überein. Beide Gene befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 in der Region 8p21.3-23.1 (Hickman *et al.* 1994).

Über interindividuelle Unterschiede hinaus fanden sich dabei auch interethnische Differenzen: 59% der kaukasischen (Cascorbi *et al.* 1995) und 75% der afrikanischen Bevölkerung (Delomenie *et al.* 1996) sind Langsam-Acetylierer. Dagegen sind unter den Asiaten die schnellen Acetylierer mit ca. 90% stark überrepräsentiert (Evans, 1993).

Schnell-Acetylierer weisen entweder ein genetisch unverändertes *NAT2*-Gen bei dem *NAT2*-Haplotyp *NAT2*4* (Wildtyp) auf oder wie beim *NAT2*-Haplotyp *NAT2*12A* eine Punktmutation auf Position 803 des *NAT2*-Gens.

Die Ausprägung des langsamen Acetylierertyps ist das Ergebnis einer oder mehrerer Punktmutationen im *NAT2*-Gen und der daraus resultierenden Bildung eines instabilen oder weniger aktiven Enzyms (Blum *et al.* 1991; Hein *et al.* 1994).

1.2.3. Mutationen und Haplotypen am *NAT2*-Locus

Bislang wurden mehr als sieben verschiedene Nukleotidtransitionen am *NAT2*-Genort nachgewiesen. Fünf dieser Mutationen verursachen Aminosäureveränderungen, zwei sind stumme Mutationen, die keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Nukleotidtransitionen am *NAT2*-Genort

Position	Nukleotidtransition	Aminosäureveränderung
191	Guanin / Alanin	Arginin / Glutaminsäure
282	Cytosin / Thymin	Keine
341	Thymin / Cytosin	Isoleucin / Threonin
481	Cytosin / Thymin	Keine
590	Thymin / Cytosin	Arginin / Glutamin
803	Alanin / Guanin	Lysin / Arginin
857	Guanin / Alanin	Glycin / Glutaminsäure

Auch hier ergaben sich interethnische Unterschiede: Während die Mutation an Position 191 von Bell *et al.* (1993) bei Afrikanern gefunden wurde, scheint sie in der kaukasischen Bevölkerung nur selten vorzukommen (Cascorbi *et al.* 1995).

Darüberhinaus zeigte sich, dass das gemeinschaftliche Auftreten von Basensubstitutionen gewissen Regeln unterliegen muss. Eine Transition an Position 341 und 803 ist in 98% der Fälle mit einer Mutation an Position 481 assoziiert. Eine Veränderung an Position 282 geht immer mit der Mutation 191A, 590A oder 857A einher (Lin *et al.* 1993). Die Mutationen wiesen also ein Kopplungsungleichgewicht auf.

Durch das charakteristische Auftreten dieser Nukleotidtransitionen sind unterschiedliche Haplotypen am *NAT2*-Genlocus identifiziert worden (Tab. 2).

Tabelle 2: Varianten von Haplotypen am *NAT2*-Genort in der kaukasischen Bevölkerung

NAT2-Haplotyp¹	Positionen der Nukleotidveränderungen	Assoziierter Acetyliererstatus
<i>NAT2*4</i>	keine (Wildtyp)	schnell
<i>NAT2*5A</i>	341, 481	langsam
<i>NAT2*5B</i>	341, 481, 803	langsam
<i>NAT2*5C</i>	341, 803	langsam
<i>NAT2*6A</i>	282, 590	langsam
<i>NAT2*7B</i>	282, 857	langsam
<i>NAT2*12A</i>	803	schnell
<i>NAT2*14A</i>	191	langsam
<i>NAT2*14B</i>	191, 282	langsam

¹Nomenklatur nach Vatsis *et al.* (1995)

Nach der Nomenklatur von Vatsis *et al.* (1995) werden heute die sechs wichtigsten in der kaukasischen Bevölkerung nachgewiesenen Haplotypen mit *NAT2*4*, **5A*, **5B*, **5C*, **6A*, und **7B* bezeichnet (Cascorbi *et al.* 1999). Gegenwärtig sind mindestens 27 Haplotypen bekannt. Zusätzlich wurden die vor allem bei Afrikanern auftretenden Haplotypen *NAT2*14A* und **14B* beschrieben. Beide Haplotypen beinhalten Mutationen an Position 191. Weitere Haplotypen wurden inzwischen beschrieben, sind aber nicht in der Konsensus-Publikation von Vatsis *et al.* (1995) enthalten (Agundez *et al.* 1996; Martinez *et al.* 1995). Alle Haplotypen folgen einem autosomal kodominanten Erbgang nach Mendelschen Gesetzen mit zwei Allelen an einem Genort.

Neuere Mutationen, die im *NAT*-Gen gefunden wurden, sind in nachstehender Tabelle erwähnt. Diese Tabelle enthält eine Liste derzeit bekannter *NAT2*-Haplotypen, die im Jahre 2000 als ein „Update“ im Rahmen einer Konsensuserklärung durch das für die Nomenklatur und Registrierung der Arylamin-*N*-Acetyltransferasen zuständige Komitee (Hein DW, Grant DM, Sim E, 2000) erstellt wurde. Nachfolgende Tabelle enthält darüber hinaus Angaben zum vorhersagbaren Phänotyp im Sinne der funktionalen Charakteristik des Polymorphismus einzelner Nukleotide der menschlichen Arylamin-*N*-Acetyltransferase (Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, Hein DW; 2001).

Tabelle 3: Liste bekannter NAT2-Haplotypen (erstellt von dem für Nomenklatur und Registrierung der Arylamin-*N*-Acetyltransferasen zuständige Komitee: Hein DW, Grant DM, Sim E, 2000), mit Angaben zum vorhersagbaren Phänotyp (Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, Hein DW; 2001), sowie mit Hinweis auf die funktionale Charakteristik des Polymorphismus einzelner Nukleotide der menschlichen Arylamin-*N*-Acetyltransferase.

Allele	Nukleotide Change(s)	Amino Acid change(s)	Phenotype
NAT2*4	None	None	Rapid
NAT2*5A	341T>C, 481C>T	I114T	Slow
NAT2*5B	341T>C, 803A>G	I114T, K268R	Slow
NAT2*5C	341T>C, 803A>G	I114T, K268R	Slow
NAT2*5D	341T>C	I114T	Slow
NAT2*5E	341T>C, 590 G>A	I114T, R197Q	Slow
NAT2*5F	341T>C, 481C>T, 759C>T, 803A>G	I114T, K268R	Slow
NAT2*6A	282C>T; 590 G>A	R197Q	Slow
NAT2*6B	590 G>A	R197Q	Slow
NAT2*6C	282C>T, 590 G>A, 803A>G	R197Q, K268R	Slow
NAT2*6D	111T>C; 282C>T, 590 G>A	Q32, R197	Slow
NAT2*7A	857G>A	G286E	Slow
NAT2*7B	282C>T, 857G>A	G286E	Slow
NAT2*10	499G>A	E167K	Unclear
NAT2*11	481C>T	None	Rapid
NAT2*12A	803A>G	K268R	Rapid
NAT2*12B	282C>T, 803A>G	K268R	Rapid
NAT2*12C	481C>T, 803A>G	K268R	Rapid
NAT2*13	282C>T	None	Rapid
NAT2*14A	191G>A	R64Q	Slow
NAT2*14B	191G>A, 282C>T	R64Q	Slow
NAT2*14C	191G>A, 341T>C, 481C>T, 803A>G	R64Q, I114T, K268R	Slow
NAT2*14D	191G>A, 282C>T, 590 G>A	R64Q, R197Q	Slow
NAT2*14E	191G>A, 803A>G	R64Q, K268R	Slow
NAT2*14F	191G>A, 341T>C, 803A>G	R64Q, I114T, K268R	Slow
NAT2*14G	191G>A, 282C>T, 803A>G	R64Q, K268R	Slow
NAT2*17	434A>C	Q145P	Slow
NAT2*18	845A>C	K282T R64W	Slow
NAT2*19	190C>T	R64W	Unclear

Phänotypisch schnelle Acetylierer sind entweder homo- oder heterozygot für das nicht mutierte, dominante Wildtypallel. Langsam-Acetylierer sind homozygot für die rezessiven mutierten Allele.

Eine Ausnahme bildet dabei das von Lin *et al.* (1993) identifizierte Allel *NAT2*12A*. Es weist nur eine Nukleotidtransition an Position 803 auf und führt als einziges mutiertes Allel zum schnellen Acetylierertyp (Cascorbi *et al.* 1996).

Die in der kaukasischen Bevölkerung am weitesten verbreiteten Haplotypen sind *NAT2*5B*, **6A* und **7B*. In mindestens 95% der Fälle ist diese Gruppe von Haplotypen für einen langsamen Acetyliererstatus verantwortlich.

1.3. Der Acetyliererstatus als möglicher Suszeptibilitätsfaktor für das Mammakarzinom und andere Karzinome

Der Metabolisierungsschritt der *N*-Acetylierung spielt eine wichtige Rolle in der Bio-transformation verschiedener Medikamente, Präkanzerogene und anderer Fremdstoffe mit Arylamin- oder Hydralazinstruktur. Zwischen dem genetisch determinierten Acetyliererstatus und dem Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen sowie dem erhöhten Risiko, an malignen Tumoren zu erkranken, ist seit langem ein Zusammenhang bekannt (Evans, 1992).

Verschiedene Studien unterstreichen die richtungsweisende Bedeutung dieser Hypothese:

Untersuchungen zeigen, dass der Polymorphismus des *NAT2*-Genotyps nicht als unabhängiger Risikofaktor für das Mammakarzinom anzusehen ist, dass der *NAT*-Status jedoch möglicherweise einen modulierenden Einfluss auf den Metabolismus von Xenobiotika, insbesondere der aromatischen Amine, ausübt und somit die individuelle Suszeptibilität von Frauen gegenüber den Inhaltsstoffen im Zigarettenrauch beeinflussen kann (Ambrosone *et al.* 1996; Hunter *et al.* 1997; Millikan *et al.* 1998).

Es ist bekannt, dass Schnell-Acetylierer eine Prädisposition für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms besitzen (Ilett *et al.* 1994; Roberts-Thomson *et al.* 1996; Gil und Lechner, 1998).

Bezüglich des Larynxkarzinom liegen nach jüngsten genotypischen Untersuchungen Hinweise darauf vor, dass die homozygot schnellen Acetylierergenotypen signifikant überrepräsentiert sind. Die Ergebnisse früherer Untersuchungen des Acetyliererphänotyps von 128 polnischen Fällen mit einem Larynxkarzinom (Drodz *et al.* 1987), die eine signifikante Überrepräsentierung der Langsam-Acetylierer ergab, konnten damit nicht bestätigt werden. Bereits 1992 fanden Roots *et al.* Schnell-Acetylierer bei einem kleinen Kollektiv mit Larynxkarzinom (n=70) leicht in der Überzahl.

Henning *et al.* (1999) wiesen den Träger des homozygot schnellen Acetylierergenotypen als Risikofaktor für das Larynxkarzinom nach. Diese Studie zeigte, dass Träger der Allele *NAT2**4/*4 und *NAT2**4/*12A eine erhöhte Suszeptibilität besitzen, an einem Larynxkarzinom zu erkranken (OR=2,18, P=0,016).

Inbezug auf das Harnblasenkarzinom besitzen Langsam-Acetylierer ein erhöhtes Risiko (Evans *et al.* 1993; Risch *et al.* 1995). Inwieweit durch einen unterschiedlichen *NAT2*-Status das mit dem Zigarettenrauchen assoziierte Risiko variiert, wird in klinischen Studien unterschiedlich gewertet.

Desweiteren wurde gezeigt, dass der Langsam-Acetyliererphänotyp unter den Fällen mit einem Harnblasenkarzinom überrepräsentiert ist besonders in Verbindung mit Nikotinabusus und beruflicher Exposition gegenüber Arylaminen (Lower *et al.* 1979; Mommsen *et al.* 1985; Roots *et al.* 1992; Brockmöller *et al.* 1996; Schöps *et al.* 1997).

Die Möglichkeit der Genotypisierung besteht nach Aufklärung der DNA-Sequenz der *NAT2* (Blum *et al.* 1990; Deguchi *et al.* 1990; Vatsis *et al.* 1991; Bell *et al.* 1993). Hierdurch konnte in der Folge aufgewiesen werden, dass auf der Basis des bekannten Genotyps der Phänotyp mit einer 95%-igen Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden kann (Hickman and Sim, 1991; Cascorbi *et al.* 1995; Mrozikiewicz *et al.* 1996).

In mehreren Studien wurde die Verteilung der *NAT2*-Genotypen bei Bronchialkarzinompatienten untersucht:

Roots *et al.* (1988) fanden eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante Überrepräsentierung der phänotypischen Schnell-Acetylierer bei 220 Fällen mit einem Bronchialkarzinom. Cascorbi *et al.* (1996) charakterisierten das *NAT2*-Gen von 155 Patienten mit einem Bronchialkarzinom. In dieser Gruppe, die sowohl die homozygot wie auch

die heterozygot Veranlagten einschloss, fand sich zunächst nur ein leichter Trend hin zu den Schnell-Acetylierern.

Die isolierte Betrachtung zeigte aber, dass die homozygoten Träger des Wildtypallels (*NAT2*4*) mit 11,4% deutlich stärker vertreten war. Die zuvor beobachtete relativ geringfügige Überrepräsentierung schneller Acetylierer konnte somit als Ausdruck einer Überrepräsentation der kleinen Untergruppe homozygoter Wildtypträger gewertet werden. Homozygote Träger des schnellen Wildtypallels zeigten weiterhin eine signifikant höhere Acetylierungsgeschwindigkeit als die heterozygoten.

Dieser Befund ist insofern von grosser Bedeutung, als er die Möglichkeit aufweist, dass durch eine Umgewichtung von Enzymaktivitäten eine Umwandlung von Stoffen zu ultimativen Karzinogenen erfolgen kann. Daneben gelten offensichtlich für unterschiedliche Gewebe jeweils differenzierte Prozesse der Toxifizierung.

Dagegen ergab die Studie von Martinez *et al.* (1995), dass Patienten vom langsamen Acetylierergenotyp, die homozygot für die Allelvarianten 341C + 481T + 803T waren, ein erhöhtes Risiko für ein Bronchialkarzinom besitzen.

Bouchardy *et al.* (1998) fanden keine signifikante Korrelation zwischen dem *NAT2*-Genotyp und dem Bronchialkarzinom (n=150).

1.4. Klinisch wissenschaftliche Fragestellung

Ziel der Untersuchung ist es nachzuweisen, ob der Acetyliererstatus mit dem Risiko der Entstehung eines Mammakarzinoms signifikant assoziiert ist.

Es soll der Nachweis erbracht werden, ob der Polymorphismus des *NAT2*-Genotyps einen eigenständigen Risikofaktor in der Ätiopathogenese des Mammakarzinoms darstellt oder nicht.

Dies soll die Frage nach einer möglichen Überrepräsentierung des Langsam- oder Schnell-Acetylierers bei Mammakarzinompatientinnen beantworten.

Zum anderen soll überprüft werden, ob der *NAT2*-Genotyp das Tumorrisiko bei Frauen mit bekannten Risikofaktoren (Alter, Menopausenstatus, Dauer der Menstruation) erhöht. Desweiteren soll die Assoziation zwischen *NAT2*-Genotyp und Nikotinabusus untersucht werden sowie die Assoziation mit Blutgruppenmerkmalen.

Schliesslich soll überprüft werden, ob der *NAT2*-Genotyp mit bestimmten Merkmalen des Mammakarzinoms (Hormonrezeptorstatus, Grading, TNM-Stadium, Histologie) korreliert ist, d.h. es soll untersucht werden, ob ein bestimmter *NAT2*-Genotyp (langsamer oder schneller Acetylierer) modulierenden Einfluss auf die besondere Ausprägung bestimmter Tumormerkmale besitzt.

Im Rahmen einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie soll das Kollektiv der Mammakarzinom-Patientinnen inbezug auf die Häufigkeit hereditärer Polymorphismen an den Genorten der *NAT2* mit einer altersgematchten Kontrollgruppe verglichen werden.

2. Material und Methode

2.1. Patientenkollektiv

In die Studie wurden 248 Patientinnen mit Mammakarzinom eingeschlossen, die in der Zeit von 1996 bis 1997 aus den Bavaria-Kliniken Kreischau (Sachsen) und Schaufeling (Bayern) rekrutiert wurden.

Es galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien:

- 1) Patientinnen mit gesichertem Mammakarzinom
- 2) Alter über 18 Jahre
- 3) Deutschstämmigkeit, infolge bekannter interethnischer Unterschiede im Fremdstoffmetabolismus gefordert. Die Daten zur Herkunft der Patientinnen wurden durch Befragung und durch Bekanntheit des Geburtsnamens ermittelt.

Bei jeder Patientin wurde mit einem standardisierten Vordruck eine gezielte Anamnese erhoben, in der folgende Daten erfasst wurden:

- Alter, Gewicht, Grösse, Beruf, Schadstoffexposition, Raucherstatus, Tumordaten mit Angabe von: Diagnose, Lokalisation des Tumors, histologischem Befund, histopathologischem Staging, Art der Tumoroperation, Hormonrezeptorstatus, Tumorgrading.
- Familiäre Belastungen mit Angabe von: Mammakarzinom bei I°-Angehörigen, bilateralem prämenopausalen Mammakarzinom bei der Mutter der Patientin.
- Daten zur Menstruation mit Angabe von: Beginn der Menarche und Beginn der Menopause.
- Daten zu schweren Begleiterkrankungen wie z. B.: schwere Herz-, Leber-, Nierenerkrankungen.
- Daten zur Blutgruppe mit Angabe von: ABO-System und Rhesus-Faktor.

•**Tumorklassifikation:**

Für das Staging wurde die postoperative histopathologische TNM-Klassifikation (pTNM) der WHO benützt.

T-Kategorien

Tis In situ

T1 \leq 2cm in grösster Ausdehnung

(T1a \leq 0,5cm; T1b $>$ 0,5cm - 1cm; T1c $>$ 1–2 cm)

T2 $>$ 2-5cm in grösster Ausdehnung

T3 $>$ 5cm in grösster Ausdehnung

T4 Tumor jeder Grösse, auf Brustwand oder Haut direkt übergreifend.

T4a Ausdehnung auf die Thoraxwand

T4b Ödem, Ulzeration, Satelittenmetastasen an der Brustwand

T4c Kriterien T4a + T4b

T4d entzündliches Karzinom

N-Kategorien

pN Regionäre Lymphknotenmetastasen

pN0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen

pN1 Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten

pN1a Mikrometastasen \leq 0,2cm

pN1b Makrometastase (n) $>$ 0,2cm

- Metastasen in 1-3 Lymphknoten - $>$ 0,2- $<$ 2,0cm

- Metastasen in $<$ 4 Lymphknoten - $>$ 0,2- $<$ 2,0cm

- Metastasenausdehnung über die Lymphknotenkapsel hinaus

- Metastasen in Lymphknoten - \geq 0,2cm

pN2 Ipsilaterale axilläre Lymphknoten untereinander oder an andere Strukturen fixiert

pN3 Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna

M-Kategorien

PM: Fernmetastasen; pM0: keine Fernmetastasen; pM1: Fernmetastasen vorhanden;

MX: Das Vorliegen von Metastasen nicht beurteilt

Daneben wurde die **Stadiengruppierung der AJC/UJCC** verwendet. Die nachfolgende Tabelle enthält die Zuordnung der TNM-Klassifikation zur Stadieneinteilung der AJC/ UJCC:

Tabelle 4: **Stadieneinteilung der AJC/UCC**

Stadium (UICC)	TNM-Klassifikation		
Stadium Iis	Carcinoma in situ		
Stadium I	T1a, T1b	N0,N1a	M0
Stadium II	T0, T1a, T1b	N0,N1a, N1b	M0
	T2a, T2b	N1b	M0
Stadium IIIA	T3a, T3b	N0,N1	M0
	T1a,b, T2a,b, T3a,b	N2	M0
Stadium IIIB	T1a,b, T2a,b, T3a,b	N3	M0
	T4a,b,c	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

•**Raucherstatus:**

Der Zigarettenkonsum wurde in Packungsjahren (PJ) angegeben (1PJ = täglicher Konsum von 20 Zigaretten über ein Jahr). Als Nichtraucher wurden Personen definiert, die noch nie geraucht hatten. Leichte Raucher wiesen 1-20 PJ in der Anamnese auf, mittlere Raucher 21-50 PJ und starke Raucher über 50 PJ.

Tabelle 5: Anamnestische Daten der Patientinnen mit Mammakarzinom

Tumorgrading %	I 8,2	II 59,1	III 32,7	
Tumorstaging %	keine Angabe 3,6	Stadium 0-2 85,1	Stadium 3-4 11,3	
Tumorhistologie %	invasiv-dukta 73,4	invasiv-lobulär 14,2	Andere 12,4	
Hormonrezeptorstatus %	Negativ 21,1	Positiv 78,0		
Dauer der Menstruation %	< 35 Jahre 46,4	>= 35 Jahre 53,6		
Raucherstatus %	Nichtraucher 72,6	1-20 PJ 23,0	21-50 PJ 2,8	> 50 PJ 1,2
Menopausenstatus %	Prämenopause 32,3	Postmenopause 67,7		
Blutgruppe %	0 50,7	A 28,4	B 14,2	AB 6,7
Rhesusfaktor %	D pos. 82,0	D neg 18,0		
Alter (Jahre) %	< 58 51,6	> 58 48,4		
Beruf %	Schadstoff-exponiert 82,7	nicht schadstoff-exponiert 17,3		

2.2. Kontrollkollektiv

In das Kontrollkollektiv wurden 248 deutschstämmige Patientinnen aufgenommen, bei denen nach anamnestischen und klinischen Kriterien keine Anzeichen für ein Malignom bestanden. Das Kontrollkollektiv umfasste 88 Patientinnen mit internistischen Erkrankungen, 64 Patientinnen mit orthopädischen, 40 Patientinnen mit urologischen, 29 Patientinnen mit neurologischen Erkrankungen und 27 freiwillige gesunde Probandinnen.

Bei jeder Kontrollperson wurde ebenfalls nach einem standardisierten Vordruck eine gezielte Anamnese im Hinblick auf die Erfassung folgender Daten durchgeführt:

Alter, Gewicht, Grösse, Beruf, Schadstoffexposition, Raucherstatus, Daten zur Menstruation mit Angabe von: Beginn der Menarche und Beginn der Menopause. Daten zu schweren Begleiterkrankungen wie z. B.: schwere Herz-, Leber-, Nierenerkrankungen. Daten zur Blutgruppe mit Angabe von: ABO-System und Rhesus-Faktor.

Tabelle 5: Demographische Daten beim Mammakarzinom und bei den Kontrollen

	Mammakarzinom-Patientinnen	Kontroll-Patientinnen
Anzahl	248	248
Alter (Jahre)	32-85	26-84
Altersmedian (Jahre)	57	60

2.3. Material

Reagentien

Taq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

2-Desoxynukleotide: dGTP, dTTP, dATP, dCTP (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Oligonukleotid-Primer (TIB Molbiol, Berlin)

Restriktionsendonukleasen *AluI*, *BamHI*, *DdeI*, *FokI*, *KpnI*, *MspI*, *TaqI* (New England Biolabs, Schwalbach)

100 bp DNA-Längenleiter (Gibco BRL, Eggenheim)

DNA-Größenstandard V, VI (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Agarose UltraPURE (Gibco BRL, Eggenheim)

Agarose, Nusieve (Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf)

Lösungen

1.) Lösungen zur Leukozytenisolierung

Erythrozytenlysepuffer (155 mM NH₄Cl; 10mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA)

TEN-Puffer (20 mM Tris; 2,5 mM EDTA; 30 mM NaCl; pH 7,5)

2.) Lösungen zur DNA-Präparation:

Natriumazetat (3 moll CH₃COONa, pH 5,5)

Salpetersäure (1N)

Chloroform (Lichrosolv, Merck Darmstadt)

Phenol-Wasser-Chloroformlösung (Perkin Elmer 400765)

2 mal Lysis-Buffer (Perkin Elmer 400766)

Ethanol (80% Ethanol; 20% 5mmol/l CDTA-Wasser)

2-Propanolol (Licrosolv, Merck Darmstadt)

Tris/EDTA (100mmol/l Tris/HCl; 10mmol/l EDTA; pH 8,0)

3.) Lösungen für die Elektrophorese:

TBE-Puffer (90mM Tris; 90mM Borsäure; 2,5mM EDTA; pH 8,0)

Orange-G-Lösung (Ficoll 20%; 10mM Tris; 1mg/ml Orange-G; pH 7,5)

Geräte

Gene Amp 9600 (Perkin Elmer) Weiterstadt

DNA-Extraktor ABI 341 (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Elektrophoresekammer (BioRad, München)

Elektrophoresekammer (Pharmacia, Freiburg)

Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

Digitale Bildverarbeitung Eagle Eye II (Stratagene, Heidelberg)

2.4. Methode

2.4.1. DNA-Isolierung

Von jedem Patienten wurden 5 bis 10 ml venösen Blutes gewonnen. Die Koagulation wurde mit EDTA verhindert. Die DNA wurde aus Leukozyten nach Proteinase-K-Verdau mittels einer manuellen 3-Schritt Phenol/Chloroform-Extraktion (Sambrook *et al.* 1989) bzw. unter Verwendung eines halbautomatischen DNA-Extraktors (341A Applied Biosystems) gewonnen.

Hierzu wurde zunächst das Vollblut mit dem 3-fachen Volumen eines hypoosmolaren Puffers

155 mmol/l NH_4Cl , pH 8,0

10 mmol/l KHCO_3

0,1 mmol/l EDTA

versetzt und 30 min. bei 4°C inkubiert. Hierdurch platzten die Erythrozyten. Die Leukozyten konnten durch Zentrifugation bei 1.200 rpm pelletiert werden. Die Leukozyten wurden in 2 ml TEN-Puffer

20 mmol/l Tris/HCL pH7,5

2 mmol/l EDTA

30 mmol/l NaCl

resuspendiert, in zwei Gefässe aliquotiert und bei -20°C bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt.

Den beiden Extraktionsverfahren, dem manuellen wie dem automatischen, liegt der Aufschluss der Leukozyten mittels Proteinase K und Natriumdodecylsulfat (SDS) zugrunde.

Beim manuellen Verfahren wurden die Leukozyten in 10ml TEN-Puffer resuspendiert, mit 100 µl 10 mg/ml Proteinase K (Roche Mannheim) und 0,5 ml 200g/l Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt und anschliessend bei 37° über Nacht inkubiert. Protein-

bestandteile wurden durch Zugabe von 5 ml Tris-Puffer-gesättigter Phenollösung gefällt und durch Zugabe von 5 ml Chloroform von der wässrigen Lösung getrennt.

Gleichzeitig wurden hierdurch lipidhaltige Bestandteile abgetrennt. Die wässrige Phase wurde erneut einer Chloroform-Extraktion unterworfen und zentrifugiert. Die in eine frische Gefäß überführte wässrige Phase wurde mit dem 2,5-fachen Volumen an 100% Ethanol versetzt und gleichzeitig 0,1 Volumen 2mol/l Natrium-Azetat pH 5,8 addiert.

Hierdurch präzipitierte die DNA und konnte entweder abzentrifugiert werden oder direkt mittels eines Glashakens aufgenommen werden. Die DNA wurde kurz in 70% Ethanol gewaschen, anschliessend getrocknet. Das Pellet wurde in 10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und bis zur weiteren Analyse bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2. Genotypisierung der NAT2-Mutationen

Die kodierende Sequenz des NAT2-Gens wurde mit Oligonukleotid-Primern P100 und P56 eingegrenzt und ein 1.211-bp-Fragment mit PCR amplifiziert. Hierzu wurden 0,5-1µl DNA-Lösung (50-100 ng DNA) zum 50 µl Reaktionsansatz hinzugegeben.

5 µl	10 fach	PCR-Puffer	(Perkin Elmer)
5 µl	2 mmol/l	dNTP	(Roche Mannheim)
1 µl	10 mmol/l	5'-Primer P100	(TIB-Molbiol)
1 µl	10 mmol/l	3'-Primer P56	(TIB-Molbiol)
4,8 µl	25 mmol/l	MgCl ₂	(Perkin Elmer)
0,2 µl	5 units/µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	(Perkin Elmer)
33 µl		H ₂ O	

Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden in den 94°C heissen Thermocycler (Perkin Elmer 9600 und Biometra Trio) gestellt und die PCR unmittelbar unter folgenden Bedingungen gestartet:

2 min. initiale Denaturierung bei 94°C; 35 Zyklen 0,5 min. Denaturierung bei 94°C; 1,5 min. Annealing und Elongation bei 67°C; gefolgt von 7 min. terminaler Elongation bei 72°C. Anschliessend wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Der Erfolg der PCR wurde mit Hilfe einer Agarol-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden 7 ml PCR-Produkt mit 5µl Blue-Marker (Life Technologies) versetzt und auf einem 1,2% Agarose-Gel (Biozym) bei 120 V für 20 min. aufgetrennt.

Als Elektrophoresepuffer diente ein üblicher TBE-Puffer:

90 mmol/l Tris pH 8,0-8,3

90 mmol/l Borsäure

2,5 mmol/l EDTA

Tabelle 6: Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation des kodierenden Abschnitts des *NAT2*-Gens und Amplifikation von kleinen Fragmenten, die mögliche Mutationen bei Positionen 191, 282, 341, 590 und 803 enthalten. Positionen 481 und 857 wurden direkt am 1.211-bp-Fragment geprüft.

Primer	Primer-länge (nt)	Fragment-länge (bp)	Sequenz	Spezifität
P100	-69 - 48	1211	5'-GTC ACA CGA GGA AAT CAA ATC C	<i>NAT2</i> -Gen (5')
P56	1142-1119	-	5'-GTT TTC TAG CAT GAA TCA CTC TGC	<i>NAT2</i> -Gen (3')
P341N*	342 - 373	442	5'-ACC CAG CAT CGA CAA TGT AAT TCC TGC CCT CA	<i>Ddel</i> -site 341 nt (3')
P87	480 - 490	421	5'-CCT GGA CCA AAT CAG GAG AG	<i>TaqI</i> und <i>Ddel</i> -site 803 nt (5')
P90	900 - 879	-	5'-ACA CAA GGG TTT ATT TTG TTC C	(3')

Aus dem 1.211-bp-Fragment konnten direkt die Positionen 481 und 857 nt auf die Mutationen C/T bzw. A/G mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *BamHI* geprüft werden. Die Mutationen führten jeweils zum Verlust der Schnittstelle der Endonuklease.

KpnI-Verdau zur Bestimmung der C⁴⁸¹T-Transition

12,5 µl		PCR-Produkt (P100/P56)
2,5 µl	110 fach	Puffer 1 (New England Biolabs)
0,5 µl	60 units/µl	<i>KpnI</i> (New England Biolabs)
9,5 µl		H ₂ O

Inkubation über Nacht bei 37°C.

BamHI-Verdau zur Bestimmung der A⁸⁵⁷G-Transition

12,5 µl		PCR-Produkt (P100/P56)
2,5 µl	10 fach	Puffer <i>BamHI</i> (New England Biolabs)
0,5 µl	200 units/µl	<i>BamHI</i> (New England Biolabs)
9,5 µl		H ₂ O

Inkubation über Nacht bei 37°C.

12,5 µl des Reaktionsprodukts wurden mit 10 µl Bluemarker versetzt und auf ein 2%-Agarose-Gel (Biozym) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 40 min. bei 80 V. Als Grössenstandard wurden 5 µl DNA-Marker V (Boehringer Mannheim) parallel aufgetrennt. Das Fragment-Muster wurde mit einem EagleEye Still-Videosystem (Stratagene) dokumentiert (Abb. 5).

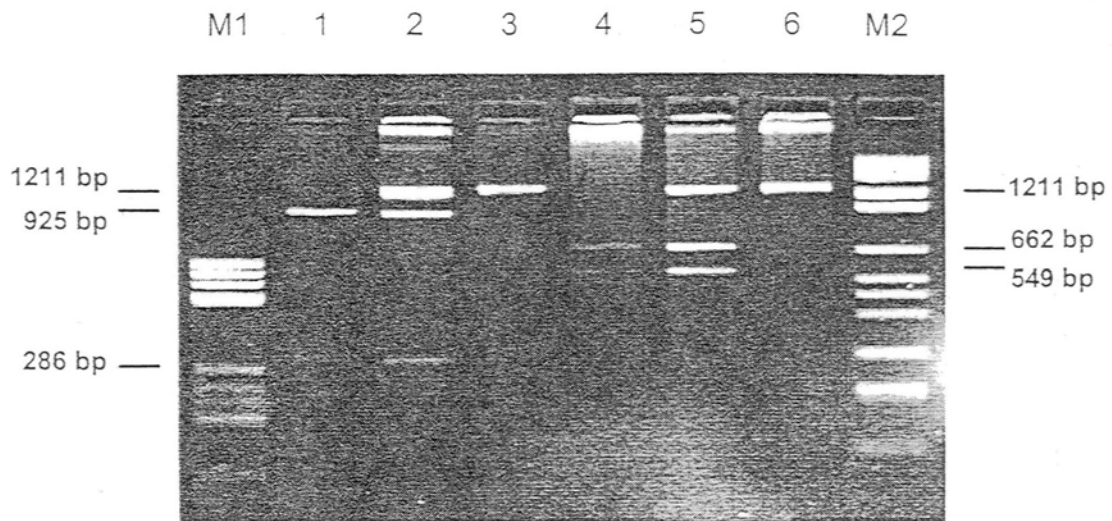


Abb.1: 2% Agarose-Gelelektrophorese von 1.211-bp-Fragmenten, die zur Überprüfung der Mutationen an NAT2-Genposition 481 nt mit *KpnI* bzw. 857 nt mit *BamHI* verdaut wurden. Die Fragmente wurden durch Anfärbung mit 1mg/l Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Zur besseren Detektierung der weiteren Mutation wurden von dem bestehenden 1.211-bp-Template eine sogenannte semi-nested PCR durchgeführt. Auf diese Weise konnte z. B. die randständig sitzende G¹⁹¹A-Mutation besser sichtbar gemacht werden und die Zahl konstitutiver Schnittstellen der Restriktionsenzyme *DdeI* und *TaqI* gesenkt werden.

Der entscheidende Vorteil war jedoch die Möglichkeit, mit einem Restriktionsverdau die T³⁴¹C-Transition nachzuweisen, indem in den 3'-Primer eine mismatch-Base und so eine *DdeI*-Schnittstelle in Abhängigkeit von der Mutation eingefügt wurde.

Diese Designed-Primer-Technik hat den Vorteil, bei Nicht-Vorliegen einer Restriktionsstelle auf Allel-spezifische Verfahren zu verzichten, die das Risiko falsch-positiver oder falsch-negativer Ergebnisse in sich bergen. Hierzu wurde ein 442-bp-Fragment, welches die Mutationen 191, 282 und 341 nt enthielt, mit den Primern P100 und P341N

amplifiziert. 1 µl des 1:10 verdünnten PCR-Amplifikates wurde zum 50 µl Reaktionsansatz hinzugegeben.

5 µl	10 mal	PCR-Puffer	(Perkin Elmer)
5 µl	2 mmol/l	dNTP	(Roche)
1 µl	10 mmol/l	5'-Primer P100	(TIB-Molbiol)
1 µl	10 mmol/l	3'-Primer P341N	(TIB-Molbiol)
4,8 µl	25 mmol/l	MgCl ₂	(Perkin Elmer)
0,2 µl	5 units/µl	Taq-DNA Polymerase	(Perkin Elmer)
33 µl		H ₂ O	

PCR-Bedingungen: 2 min. 94°C; 14 Zyklen (0,5 min. 94°C, 1,5 min. 67°C); 7 min. 72°C.

MspI-Verdau zur Bestimmung der G¹⁹¹A-Transition

12,5 µl		PCR-Produkt (100/341N)	
2,5 µl	10 fach	Puffer 2	(New England Biolabs)
0,5 µl	100 units/µl	<i>MspI</i>	(New England Biolabs)
9,5 µl		H ₂ O	

Inkubation über Nacht bei 37°C.

FokI-Verdau zur Bestimmung der C²⁸²T-Transition

12,5 µl		PCR-Produkt (100/341N)	
2,5 µl	10 fach	Puffer 4	(New England Biolabs)
0,5 µl	20 units/µl	<i>FokI</i>	(New England Biolabs)
9,5 µl		H ₂ O	

Inkubation über Nacht bei 37°C.

*Dde*I-Verdau zur Bestimmung der T³⁴¹C-Transition

12,5 µl		PCR-Produkt (100/341N)
2,5 µl	10 fach	Puffer 3 (New England Biolabs)
0,5 µl	10 units/µl	<i>Dde</i> I (New England Biolabs)
9,5 µl		H ₂ O

Inkubation über Nacht bei 37°C.

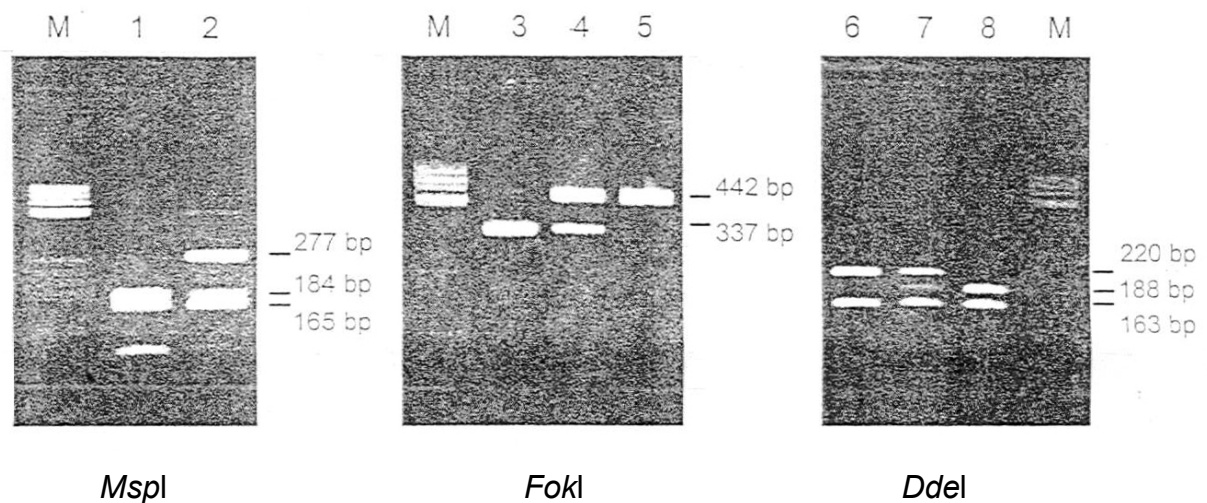


Abb.2: 3% Agarose-Gelelektrophorese von 442-bp-Fragmenten, die zur Überprüfung der Mutationen an *NAT2*-Genposition 191 nt mit *Mspl*, 282 nt mit *FokI* bzw. mit *DdeI* verdaut wurden. Die Fragmente wurden durch Anfärbung mit 1mg/l Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Zur Determinierung möglicher Mutationen an den Positionen 590 nt und 803 nt wurde ähnlich vorgegangen. Nach Amplifikation eines 421-bp-Fragmentes wurde dieses zwei verschiedenen Restriktionsverfahren unterworfen. Es wurden wieder 1µl des 1:10 verdünnten initialen 1.211-bp-Templates eingesetzt.

5 µl	10 fach	PCR-Puffer	(Perkin Elmer)
5 µl	2 mmol/l	dNTP	(Boehringer Mannheim)
1 µl	10 mmol/l	5'-Primer P87	(TIB-Molbiol)
1 µl	10 mmol/l	3'-Primer P90	(TIB-Molbiol)
4,8 µl	25 mmol/l	MgCl ₂	(Perkin Elmer)
0,2 µl	5units/µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	(Perkin Elmer)
33 µl		H ₂ O	

PCR-Bedingungen: 2min.94°C; 14 Zyklen (0,5 min. 94°C, 1,0min. 60°C, 1min. 72°C); 7min. 72°C.

*Taq*I-Verdau zur Bestimmung der G⁵⁹⁰A-Transition

12,5 µl		PCR-Produkt (87/90)	
2,5 µl	10 mal	Puffer <i>Taq</i> I	(New England Biolabs)
0,5 µl	20 units/µl	<i>Taq</i> I	(New England Biolabs)
9,5 µl		H ₂ O	

Inkubation 3-4 Stunden bei 65°C.

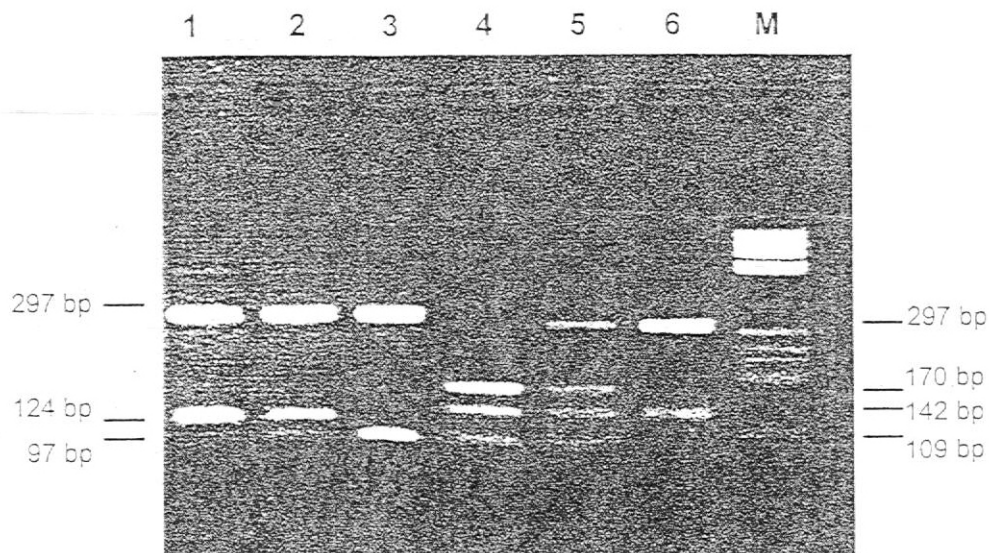


Abb.3: 3% Agarose-Gelelektrophorese von 421-bp-Fragmenten, die zur Überprüfung der Mutationen an *NAT2*-Genposition 590 nt mit *Taq*I und 803 nt mit *Dde*I verdaut wurden. Die Fragmente wurden durch Anfärbung mit 1mg/l Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

DdeI-Verdau zur Bestimmung der A⁸⁰³G-Transition

12,5 µl		PCR-Produkt (87/90)	
2,5 µl	10 fach	Puffer 3	(New England Biolabs)
0,5 µl	10 units/µl	<i>DdeI</i>	(New England Biolabs)
9,5 µl		H ₂ O	

Inkubation über Nacht bei 37°C.

Tabelle 7: Restriktionsendonukleasen zur Erkennung der *NAT2*-Mutation

Position	Transition	Restriktionsendonukleasen	Erkennungssequenz	Präamplifikation mit Primer	Schnittpositionen (nt) Wildtyp Mutation	Fragment-Länge(bp) Wildtyp Mutation
191	G->A	<i>MspI</i>	G'GC_C AG'CT	100/341N*	96 189 96	184 163 93 277 165
282	C->T	<i>FokI</i>	GGATGnnnnn Nnnn'nnnn_	100/341N*	268	337 165 442
341	T->C	<i>DdeI</i>	C'TnA_G	100/341N*	-2 153 -2 153 341	220 163 59 188 163 59 32
481	C->T	<i>KpnI</i>	C'GTAC'C	100/56	480	662 549 1211
590	G->A	<i>TaqI</i>	T'CG_A	87/90	588 730 730	170 142 109 279 142
803	A->G	<i>DdeI</i>	C'TnA_G	87/90	776 776 803	297 124 297 97 27
857	G->A	<i>BamHI</i>	C'GTAC_C	100/56	856	925 286 1211

2.5. Statistik

Als Schätzgrösse für das relative Risiko wurde die Odds ratio (beobachtete Häufigkeit/erwarteter Häufigkeit) gewählt. Die Berechnung der Odds ratio und des 95%-Vertrauensbereichs erfolgte mit der Methode nach Thomas und Gard (1977).

Als Signifikanzniveau galt $P = 0,05$. Es waren mindestens 200 Patienten für diese Fall-Kontroll-Studie notwendig, um bei einem Fehler erster Art von 0,05 und einem Fehler zweiter Art von 0,2 eine als klinisch relevant geltende Odds ratio von 1,75 zu erfassen zu können.

Die erwarteten Genfrequenzen innerhalb der Kontrollgruppe wurden nach den auftretenden Allelhäufigkeiten mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) ermittelt. Unterschiede in der Präsenz der Gene und Allele wurden mit dem exakten Fisher-Test geprüft und als Odds ratio mit den 95%-Konfidenzintervallen sowie dem Fehler erster Ordnung angegeben.

Die logistische Regressionsanalyse berücksichtigte das Alter, BMI und Anzahl der Packungsjahre als kontinuierliche Variable, den Acetyliererstatus als kategoriale Variable. Die Kalkulation erfolgte mittels SPSS 9,0.

2.6. Ethische Grundlagen und Datenschutz

Die Patienten wurden über die Zielsetzung der Studie informiert; sie gaben danach ihr Einverständnis in schriftlicher Form. Die Patientendaten wurden in anonymisierter Form (fortlaufende Nummer, Initialen und ID-Nr.) erhoben und gespeichert. Die DNA wurde ausschliesslich für diagnostische Zwecke verwendet und in Probengefässen mit fortlaufender Nummerierung ohne weitere Kennzeichnung verwahrt. Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Sachsen mit einem positiven Votum bedacht.

3. Ergebnisse

3.1. Genotypisierung der Arylamin-*N*-Acetyltransferase 2 bei Mammakarzinom- und Kontrollpatientinnen

Es wurde die Häufigkeit der in der kaukasischen Bevölkerung hauptsächlich vorkommenden Haplotypen *NAT2*4*, **5A*, **5B*, **5C*, **6A*, **7B* und der seltenen Haplotypen *NAT2*12A* und **14B* in beiden Patientenkollektiven bestimmt (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der *NAT2*-Allele bei 248 Mammakarzinompatientinnen und 248 Kontrollen.

Allele	Mutation (nt)	Phänotyp	Fälle		Kontrollen		Odds-ratio	95-C.L.
			n	%	n	%		
<i>NAT2*4</i>	keine (WT)	schnell	124	25,0	114	23,0	1,17	0,83-1,51
<i>NAT2*12A</i>	A ⁸⁰³ G	schnell	1	0,2	1	0,2	1,00	0,01-78,60
<i>NAT2*5A</i>	T ³⁴¹ C; C ⁴⁸¹ T	langsam	4	0,8	15	3,0	0,26	0,06-0,83
<i>NAT2*5B</i>	T ³⁴¹ C; C ⁴⁸¹ T, A ⁸⁰³ G	langsam	195	39,3	205	41,3	0,92	0,71-1,19
<i>NAT2*5C</i>	T ³⁴¹ C; A ⁸⁰³ G	langsam	5	1,0	10	2,0	0,49	0,13-1,60
<i>NAT2*6A</i>	C ²⁸² T + G ⁵⁹⁰ A	langsam	155	31,1	141	28,4	1,14	0,86-1,52
<i>NAT2*7B</i>	C ²⁸² T; G ⁸⁵⁷ A	langsam	11	2,2	10	2,0	1,10	0,42-2,92
<i>NAT2*14B</i>	G ¹⁹¹ A; C ²⁸² T	langsam	1	0,2	0	0,0	-	-
Total			496	100,0	496	100,0		

^a Die Odds-Ratio wurde aus dem Quotienten der zu untersuchenden Allelzahlen und allen anderen Allelen bei den Fällen mit Mammakarzinom, verglichen mit der Ratio unter den Kontrollen, ermittelt. ^b P=0,009 (exakter Fisher's Test).

Die Untersuchung zeigte, dass das Wildtypallel *NAT2*4* im Kollektiv der Mammakarzinompatientinnen etwas häufiger als im Kontrollkollektiv auftrat. Dies gilt ebenso für das *NAT2*6A*-Allel. Die meisten übrigen Haplotypen (*NAT2*5A*, **5B*, **5C*) traten geringfügig seltener in der Gruppe der Mammakarzinome auf.

Die *NAT2*12A*-, *NAT2*7B*- und die *NAT2*14B*-Allele waren etwa gleich verteilt.

Statistisch signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der *NAT2*-Haplotypen konnten zwischen den untersuchten Kollektiven jedoch nicht festgestellt werden.

Aus der Kombination der acht identifizierten Haplotypen der Arylamin-*N*-Acetyl-Transferasen ergeben sich 21 mögliche Genotypen, die für beide Untersuchungskollektive ermittelt wurden.

Die Verteilung der Genotypen im Kontrollkollektiv entsprach der erwarteten, nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechneten Häufigkeitsverteilung. Somit stellte die Kontrollgruppe eine repräsentative Stichprobe dar.

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung der NAT2-Genotypen bei 248 Mammakarzinompatientinnen und 248 Kontrollen

NAT2-Genotyp	Mammakarzinom		Kontrollen beobachtet		erwartet
	n	%	n	%	
*4/*4	15	6,0	12,0	4,8	5,3
*4/*5A	2	0,8	3,0	1,2	1,4
*4/*5B	52	21,0	48,0	19,4	19,0
*4/*5C	3	1,2	2,0	0,8	0,9
*4/*6A	36	14,5	31,0	12,5	13,1
*4/*7B	1	0,4	6,0	2,4	0,9
*6A/*12A	1	0,4	1,0	0,4	0,1
nicht gefunden	-	-	-	-	0,3
Heterozygot	110	44,4	103,0	41,5	41,0
*5A/*5B	-	-	2,0	0,8	0,1
*5A/*5B	2	0,8	8,0	3,2	2,5
*5B/*5B	36	14,5	43,0	17,3	17,1
*5A/*5C	2	0,8	4,0	1,6	1,7
*5B/*6A	60	24,2	58,0	23,4	23,5
*5B/*7B	6	2,4	1,0	0,4	1,7
*5B/*14A	1	0,4	-	-	-
*5C/*6A	-	-	4,0	1,6	1,1
*6A/*6A	27	10,9	22,0	8,9	8,1
*5B/*7B	4	1,6	3,0	1,2	1,1
Nicht gefunden	-	-	-	-	2,1
Summe der Langsam-Acetylierer	138,0	55,6	145,0	58,5	59,0
Total	248	100,0	248	100,0	100,0

^a Die erwarteten Häufigkeiten wurden aus den Allelhäufigkeiten entsprechend dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium errechnet;

^b Genotypen, die in keiner der beiden Gruppen entdeckt wurden, wurden nicht aufgelistet.

Die homozygot schnellen Acetylierergenotypen NAT2*4/*4 und *4/*12A waren in der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen nicht überrepräsentiert. Deshalb wird bei der Fall- und Kontroll-Gruppe im folgenden alleine zwischen Schnell- und Langsam-Acetylierern unterschieden.

Im Hinblick darauf, dass durch die Genotypisierung mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit der Acetyliererphänotyp vorhergesagt werden kann (Grant *et al.* 1993; Cascorbi *et al.* 1995), wurde die Häufigkeitsverteilung der langsamen und schnellen Acetylierer in beiden Kollektiven untersucht.

In der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen waren 55,6% der Fälle und in der Gruppe der Kontrollen 58,5% der Fälle genotypische Langsam-Acetylierertypen.

Die schnellen Acetylierer, die entweder homozygot oder heterozygot für das unmutierte Wildtypallel *NAT2*4* sowie für die *NAT2*12A* sind, waren in 44,4% der Fälle mit Mammakarzinom und in 41,1% der Kontrollen nachweisbar.

Die Verteilung der Schnell- und der Langsam-Acetylierern erwies sich in beiden Gruppen als etwa gleich. Schnell-Acetylierer fanden sich etwas häufiger; dies erreichte aber keine statistische Signifikanz.

Tabelle 10: Häufigkeit der *NAT2*-Genotypen unter den 248 Mammakarzinom-Patientinnen und den 248 Kontrollen

Genotyp	Mammakarzinom beobachtet		Kontrollen beobachtet		erwartet	Odds-ratio ^a	95%C.L.	P
	%	95% C.L.	%	95%C.L.				
schnell-schnell	6,0	3,4-9,8	4,8	2,5-8,3	5,3	1,31	0,59-2,91	0,50
schnell-langsam	38,4	32,2-44,7	36,7	30,7-43,0	35,7	1,10	0,76-1,59	0,62
langsam-langsam	55,6	49,2-61,9	58,5	52,1-64,7	59,0	1,00	-	-
S/S+S/L	44,4		41,1			1,12	0,97-1,60	0,53

^a verglichen mit langsam/langsam-Genotypen

Die Stratifizierung nach Untergruppen ergab, dass schnelle Acetylierer nur in der Gruppe der jüngeren Patientinnen mit Mammakarzinom überrepräsentiert waren. Innerhalb der Kontrollgruppe variierte die Häufigkeit.

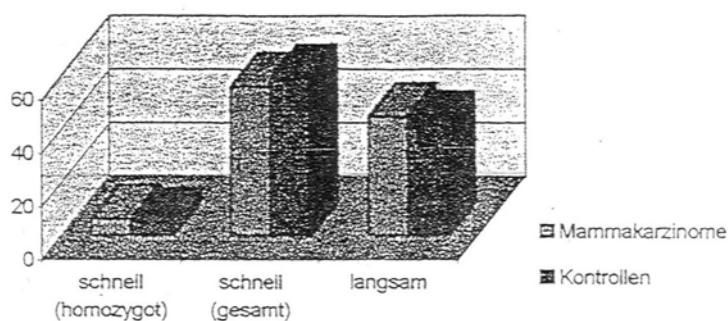


Abb.4: Häufigkeitsverteilung der langsamen, schnellen und homozygot schnellen Acetylierer-Genotypen in Mammakarzinom- und Kontrolltypen

3.2. Stratifizierung nach dem Alter

Im Hinblick auf den Parameter Alter wurde die Häufigkeit der schnellen Acetylierertypen in der Gruppe der Mammakarzinome und in der Gruppe der Kontrollen verglichen.

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen mit Mammakarzinom betrug 58 Jahre. Beim Vergleich der Mammakarzinomgruppe mit den Kontrollen wurde weder bei den Patientinnen über 58 Jahre noch bei den Patientinnen unter 58 Jahre ein signifikanter Unterschied in bezug auf den Status des schnellen Acetylierers beobachtet.

Tabelle 11: Verteilung der schnellen Acetylierergenotypen in Abhängigkeit vom Alter

Alter	Fälle/ Kontrollen	NAT2-schnell Fälle (%)	NAT2-schnell Kontrollen (%)	Odds ratio	95%-VB	P
<58	128/116	45,3	36,2	1,46	0,87-2,44	0,15
>58	120/132	43,3	46,2	0,89	0,54-1,46	0,65

3.3. Stratifizierung nach dem Ausmass des Zigarettenkonsum

247 Mammakarzinom-Patientinnen wurden detailliert zu ihren Rauchgewohnheiten (Art und Menge) gefragt.

72,9 % (180/247) der Patientinnen mit Mammakarzinom waren Nichtraucherinnen. 27,1% der Mammakarzinom-Patientinnen wiesen eine positive Raucheranamnese auf. Die überwiegende Mehrzahl der Raucherinnen (n=57; 85,1%) war der Gruppe der leichten Raucher (1-20 PJ) zuzuordnen, ein kleiner Teil (n=7; 10,4%) der Gruppe der mittelstarken Raucher (20-50 PJ) und ein noch geringerer Teil (n=3; 4,5%) der Gruppe der starken Raucher (> 50 PJ). Der Vergleich wurde mit Kontrollen durchgeführt, die rauchten und dem schnellen NAT2-Genotyp zuzuordnen waren.

In der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen konnte eine leichte Zunahme der Schnell-Acetylierer mit steigendem Zigarettenkonsum beobachtet werden (s. Tabelle 12). Dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Tabelle 12: Verteilung der schnellen Acetylierer in der Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen und der Kontrollen in Abhängigkeit von der Rauchergewohnheiten

Zigarettenkonsum	Fälle/ Kontrollen n	NAT2-schnell Fälle (%)	NAT2-schnell Kontrollen (%)	Odds ratio	95%-VB	P
0 PY	180/120	43,9	43,3	1,02	0,64-1,63	0,92
1-20 PY	57/68	47,4	39,7	1,37	0,67-2,78	0,39
21-50 PY	7/41	57,1	41,5	1,88	0,37-9,52	0,36 ^a
>50 PY	3/9	0,0	44,4	-	-	-

^ap nach exaktem Fisher-Test ermittelt

Die logistische Regressionsanalyse unter Einbeziehung der Parameter: Alter, BMI, Nikotin (PJ) erbrachte für die schnellen Acetylierer im Vergleich zu den langsamen Acetylierern kein signifikant erhöhtes relatives Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken (relatives Risiko 1,05; 95%-VB: 0,67-1,67; P:0,82).

Für die schnellen Acetylierer war im Vergleich mit den langsamen Acetylierern das relative Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, auch unter der Voraussetzung nicht signifikant erhöht, wenn für die logistische Regressionsanalyse allein die Parameter Alter und Gewicht der Patientinnen berücksichtigt wurden (relatives Risiko: 1,10; VB-95%: 0,70-1,74; P:0,67).

3.4. Stratifizierung nach Blutgruppenmerkmalen

Bei 59,7% (148/248) der Mammakarzinompatientinnen und bei 41,9% (104/ 248) der Kontrollen wurden Blutgruppenmerkmale des AB0-Systems ermittelt. Darüberhinaus

wurden bei 82,0% (178/217) der Mammakarzinompatientinnen und bei 18,0% (39/ 217) der Kontrollen zusätzlich Blutgruppenmerkmale des Rhesus-Faktor-Systems eruiert. Wie Tabelle 13 zeigt, fällt die hohe Frequenz der schnellen Acetylierer bei den Trägerinnen der Blutgruppe B auf. Einschränkend muss jedoch auf die geringe Anzahl von Fällen mit Blutgruppe B (n=21) hingewiesen werden. Signifikante Differenzen zwischen schnellen Acetylierern der Tumorgruppe und den Kontrollen wurden nicht beobachtet.

Tabelle 13: Verteilung der schnellen Acetylierer bei Mammakarzinomfällen und Kontrollen in Abhängigkeit von Blutgruppenmerkmalen

Blut- gruppe	Fälle/ Kontrolle (n)	NAT2-schnell Fälle (%)	NAT2-schnell Kontrollen(%)	Odds ratio	95%-VB	P
0	75/57	36,0	42,1	0,77	0,38-1,57	0,48
A	42/26	39,6	36,5	1,14	0,62-2,11	0,67
B	21/21	61,9	52,4	1,48	0,43-5,05	0,53
AB	10/0	50,0	-	-	-	-
Rhesus Faktor	Fälle/ Kontrolle (n)	NAT2-schnell Fälle (%)	NAT2-schnell Kontrollen (%)	Odds ratio	95%-VB	P
D pos.	178/132	41,6	40,2	1,06	0,67-1,68	0,80
D neg.	39/24	38,5	33,3	1,25	0,43-3,63	0,68

Die NAT2-Genotypen wurden im Hinblick auf bestimmte Subtypen der Fälle mit einem Mammakarzinom untersucht: Menopausenstatus, Dauer der Menstruation, histologisches Grading, Stadium der Tumorerkrankung, Hormonrezeptorstatus, Tumorphistologie.

3.5. Stratifizierung innerhalb des Mammakarzinomkollektivs

3.5.1. Menopause

Zwischen prä- und postmenopausalen Mammakarzinom-Patientinnen fanden sich keine signifikanten Differenzen bezüglich des schnellen NAT2-Genotyps.

Tabelle 14: Verteilung der schnellen Acetylierer bei prä- und postmenopausalen Fällen im Kollektiv der Mammakarzinome

Menopause	n	NAT2-schnell (%)	Odds ratio	95%-VB	P
Prä-	80	45,0	1,00	-	-
Post-	168	44,0	0,96	0,56-1,64	0,68

3.5.2. Menstruationsdauer

Zwischen Mammakarzinom-Patientinnen mit einer Menstruationsdauer >35 Jahre und solchen mit einer Menstruationsdauer <35 Jahre fanden sich keine signifikanten Differenzen bezüglich des schnellen Acetyliererstatus.

Tabelle 15: Verteilung der schnellen Acetylierer in Abhängigkeit von der Menstruationsdauer

Menstruationsdauer (Jahre)	n	NAT2-schnell (%)	Odds ratio	95%-VB	P
> 35	104	46,2	1,00	-	-
< 35	120	43,3	0,89	0,53-1,51	0,67

3.5.3. TNM-Klassifikation

In Anlehnung an das TNM-Stadium der WHO-Klassifikation wurden die Patientinnen mit Mammakarzinom in 2 Gruppen unterteilt. Eine exakte Bestimmung des TNM-Stadiums konnte bei 96% (239/248) der Patientinnen vorgenommen werden.

Der ersten Gruppe, die mit 88,3% (211/239) die Mehrheit des Kollektivs darstellte, wurden alle Patientinnen mit Carcinoma in situ, Stadium I und Stadium II zugeordnet, der zweiten Gruppe 11,7% (28/239) der Tumorpatientinnen mit fortgeschrittenem Tumorstadium III und IV.

Tabelle 16: Verteilung der schnellen Acetylierer in Abhängigkeit vom Tumorstadium im Kollektiv der Mammakarzinome

Stadium	n	NAT2-schnell (%)	Odds ratio	95%-VB	P
Tis – II	211	44,1	1,00	-	-
III-IV	28	57,1	1,69	0,76-3,75	0,19

Das Vorherrschen eines bestimmten *NAT2*-Genotyps bei den lokoregionär begrenzten oder den fortgeschrittenen Stadien konnte nicht beobachtet werden.

Beim vorliegenden Kollektiv war die ungleiche Verteilung früher und später Tumorstadien mit einem deutlichen Überwiegen der frühen Stadien auffallend. Diese Beobachtung wird durch den Umstand erklärt, dass sich die Proben aus dem Bereich onkologischer Rehabilitationseinrichtungen rekrutieren, die in aller Regel von Patientinnen mit früheren Tumorstadien in Anspruch genommen werden.

3.5.4. Grading

Bei 88,4% (220/249) der Patientinnen lagen Angaben zum Differenzierungsgrad des Mammakarzinoms vor.

Nachfolgende Tabelle macht die Verteilung des Gratings unter den Probandinnen deutlich sowie auch die statistische Wertigkeit dieser Verteilung.

Bezüglich des schnellen Acetyliererstatus fanden sich danach zwischen Mammakarzinom-Patientinnen mit unterschiedlichem Grading (I-III) keine signifikanten Differenzen.

Tabelle 17: Verteilung der schnellen Acetylierer in Abhängigkeit vom Grading im Kollektiv der Mammakarzinome

Tumor-Grading	n	NAT2-schnell (%)	Odds ratio	95%-VB	P
I	18	55,6	1,00	-	-
II	130	46,2	0,69	0,25-1,85	0,67
III	72	43,1	0,61	0,21-1,71	0,34

3.5.5. Tumorhistologie

Wie die nachstehende Tabelle 18 zeigt, konnte bei 93,6% (233/249) der Patientinnen mit einem Mammakarzinom die spezifische Tumorhistologie ermittelt werden.

Tabelle 18: Verteilung der schnellen Acetylierer in Abhängigkeit von der Tumorhistologie im Kollektiv der Mammakarzinome

Tumor-Histologie	n	NAT2-schnell (%)	Odds ratio	95%-VB	P
Invasiv-duktral	171	40,4	1,00	-	-
Invasiv-lobulär	33	63,6	2,59	1,20-5,60	0,014
andere	29	48,3	1,38	0,63-3,04	0,420

Die Auswertung ergab eine signifikante Überrepräsentierung der schnellen Acetylierer-genotypen in der Gruppe der Patientinnen mit einem invasiv-lobulären Mammakarzinom im Vergleich mit der Gruppe, die eine invasiv-duktales Tumorhistologie aufwies.

3.5.6. Hormonrezeptorstatus

Bei 84,3% (209/248) der Patientinnen war der Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms bekannt. Danach hatten 21,1% (44/209) der Patientinnen einen negativen und 79,9% (165/209) einen positiven Hormonrezeptorstatus. 27,3% (12/44) der Patientin-

nen mit einem negativen Hormonrezeptorstatus und 50,9% (84/165) der Patientinnen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus waren schnelle Acetylierer.

Inbezug auf den schnellen Acetyliererstatus fand sich zwischen der Gruppe Hormonrezeptor-positiver und Hormonrezeptor-negativer Mammakarzinom-Patientinnen ein signifikanter Unterschied (Odds ratio: 2,77; 95%-VB: 1,32-5,74; P=0,005).

Unter den Hormonrezeptor-positiven Fällen wurden signifikant häufiger Schnell-Acetylierer als unter den Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinom-Fällen beobachtet. Ein auffallender Befund war die geringe Anzahl der schnellen Acetylierer unter den Hormonrezeptor-negativen Fällen. Langsam-Acetylierer kamen unter den Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinom-Fällen erheblich häufiger vor als unter den Hormonrezeptor-positiven Fällen.

Hiernach haben schnelle Acetylierer ein deutlich erhöhtes Risiko, an einem Mammakarzinom mit positivem Hormonrezeptorstatus zu erkranken als langsame Acetylierer.

Tabelle 19: Verteilung der schnellen Acetylierer in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus im Kollektiv der Mammakarzinome

Hormonrezeptorstatus	n	NAT2-schnell (%)	Odds ratio	95%-VB	P
negativ	44	27,3	1,00	-	-
positiv	165	50,9	2,77	1,32-5,74	0,005

Unter Einbeziehung des positiven Hormonrezeptorstatus, der Histologie eines invasiv-lobulären Mammakarzinoms und des Alters erbrachte die logistische Regressionsanalyse für Träger des schnellen Acetylierertyps ein relatives Risiko von 2,4 (95%-VB:1,04-5,61; P: 0,04).

Das heisst, dass, wenn man das Alter und den Hormonrezeptorstatus mitberücksichtigt, der schnelle Acetylierertyp ein 2,4-fach höheres Risiko besitzt, ein invasiv-lobuläres Mammakarzinom zu entwickeln. Dabei kommt dem Alter keine entscheidende Rolle zu; mit dem Parameter des positiven Hormonrezeptorstatus dagegen wird das relative Risiko für ein Mammakarzinom deutlich erhöht.

4. Diskussion

4.1. Verteilung der Acetylierergenotypen bei Mammakarzinom-Patientinnen in Abhängigkeit von individuellen Bedingungen.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Verteilung der Schnell- und Langsamacetylierer keinen unabhängigen Risikofaktor für das Mammakarzinom darstellt. Zwar waren die Träger des schnellen *NAT2*-Genotyps (Wildtyp) etwas häufiger bei den Mammakarzinomfällen als in den Kontrollen vertreten; dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Der schnelle *NAT2*-Genotyp erscheint somit nicht als ein Parameter, der als unabhängiger Risikofaktor für das Mammakarzinom eingestuft werden kann.

Darüberhinaus zeigte vorliegende Studie, dass die homozygot schnellen Acetylierergenotypen, d.h. die Träger der Allele *NAT2**4/*4 und *NAT2**4/*12, nicht nennenswert vertreten waren. Für das Mammakarzinom sind sie damit nicht als ein Faktor der erhöhten Suszeptibilität anzusehen. Sie besitzen nicht die gleiche Bedeutung wie für das Bronchialkarzinom und das Larynxkarzinom (Henning *et al.* 1999).

Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden jüngerer genotypischer Arbeiten zu diesem Thema überein (Agundez *et al.* 1995; Ambrosone *et al.* 1996; Hunter *et al.* 1997; Millikan *et al.* 1998), die ebenfalls zeigten, dass der Polymorphismus des *NAT2*-Genotyps nicht als unabhängiger Risikofaktor für das Mammakarzinom anzusehen ist und darüberhinaus in seinem Potential als Risikofaktor (Huang *et al.* 1999) nicht vergleichbar ist mit den bekannten konventionellen Risikofaktoren ("major risk factors": genetische Prädisposition; hormonelle Einflüsse), deren Anteil am Brustkrebsrisiko bei 45-55% liegt (Madigan *et al.* 1995).

In diesem Zusammenhang gelangten Dunning *et al.* (1999) in einem "Review über genetische Polymorphismen und Brustkrebsrisiko" zu dem Schluss, dass keine eindeutige Gewissheit darüber besteht, dass irgendeiner der bekannten genetischen Polymorphismen streng mit dem Risiko eines Mammakarzinoms assoziiert ist.

Allerdings erlauben nach Ansicht Dunnings einige Polymorphismen, wie zum Beispiel: BRCA1; COMT; CYP17; CYP1A1; NAT1; NAT2 die noch beste Einschätzung eines Brustkrebsrisikos, insofern man mit ihrer Hilfe ein relatives Risiko von 1,5 exakt genug ausschliessen kann.

Hierin haben sie ihre Bedeutung, die sie von anderen Polymorphismen: ER; EDH17B2; CYP2D6; CYP2E1; GSSTT1; HSP70; PR; TNF-alpha unterscheidet, die für eine Risikoabschätzung des Brustkrebses zu ungenau sind.

Frühere Studien zur Korrelation zwischen Acetylierertyp und Brustkrebsrisiko waren Fall-Kontroll-Studien mit meist kleineren Fallzahlen.

Zum Acetylierer-Phänotyp bei Frauen mit Mammakarzinom liegen mehrere Studien vor:

Die erste Studie von Bulowskaya *et al.* (1978) zeigte eine Überrepräsentierung des schnellen Acetylierertyps (68%) bei Patientinnen mit einem meist fortgeschrittenen Mammakarzinom (n= 41) im Vergleich mit einer altersgematchten Kontrollgruppe nicht krebserkrankter Probandinnen (n=38, überwiegend Herzkreislaferkrankungen), unter denen der schnelle Acetylierertyp nur in 38% der Fälle auftrat (Testsubstanz: Sulfamethazin).

Vermutlich besass die Mehrheit der Mammakarzinompatientinnen ein Stadium IV der Erkrankung; eine exakte Tumorstadieneinteilung war in der Studie nicht vorgegeben. In der Folge wurde deshalb kritisch angemerkt, ob nicht der schnelle Acetyliererstatus nur ein Epiphänomen des fortgeschrittenen Tumorstadiums beim Mammakarzinom darstellte. Zudem lag es nahe, einen paraneoplastischen Effekt inbezug auf die polymorphe NAT-Aktivität zu unterstellen, da auffallenderweise bei sechs der Patientinnen nach Mastektomie der Acetyliererphänotyp sich änderte

In der Folge durchgeführte phänotypische Studien (Huober *et al.* 1991, Ladero *et al.* 1987; Ladero *et al.* 1991; Philip *et al.* 1987; Webster *et al.* 1989), die ebenfalls mit überwiegend kleinen Fallzahlen durchgeführt wurden, bestätigten das Ergebnis von Bulowskaya nicht.

Im Gegenteil: alle Studien widerlegten die Vermutung, der Polymorphismus des hepatischen Acetylierer-Typs korreliere mit einem erhöhten Risiko für das Mammakarzinom,

d.h. durch diese Studien konnte nicht der Nachweis erbracht werden, dass aufgrund der Prävalenz eines schnellen Acetylierertyps Mammakarzinomfälle und Kontrollen signifikant differenziert werden könnten

Die meisten der zurückliegenden Untersuchungen benützten phänotypische Methoden, deren Ergebnisse nicht frei von dem Verdacht der Beeinflussung durch die Brustkrebs-erkrankung oder durch eine Chemotherapie waren.

Drei grosse von Ambrosone *et al.* 1996, Hunter *et al.* 1997 und Millikan *et al.* 1998 prospektiv durchgeführte genotypische Untersuchungen stimmten mit den Ergebnissen der phänotypischen Vorgängerstudien grundsätzlich darin überein, dass eine unabhängige Interaktion zwischen *NAT2*-Genotyp und Mammakarzinomrisiko nicht besteht oder allenfalls schwach ausgeprägt ist.

4.2. Assoziationen des schnellen *NAT2*-Genotyps mit der Tumorphistologie bei Mammakarzinomen

Ein auffallendes Ergebnis war die signifikante Überrepräsentierung der schnellen Acetylierergerotypen in der Gruppe der invasiv-lobulären Tumorphistologien (n=33) im Vergleich mit invasiv-duktalem Tumorphistologien (OR: 2,59; 95%-VB: 1,20-5,60). Der Stellenwert dieses Befundes wird jedoch durch die geringe Anzahl eingeschränkt, so dass eine Überprüfung des Ergebnisses auf dem Boden statistisch relevanter Fallzahlen erforderlich erscheint, um gegebenenfalls von einem tatsächlich erhöhten Risiko des schnellen Acetylierertyps in bezug auf die Entwicklung eines Mammakarzinoms mit einer invasiv-lobulären Histologie ausgehen zu können.

Dieser Befund stimmt mit der Beobachtung von Agundez *et al.* (1995) überein, der bei einer allerdings sehr kleinen Anzahl (n=7) von Fällen mit einem invasiv-lobulären Mammakarzinom durchgängig den schnellen *NAT2*-Genotyp feststellte. In dieser genotypischen Studie fanden sich darüberhinaus keine weiteren unterstützenden Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem *NAT2*-Polymorphismus und anderen histologischen Subtypen des Mammakarzinoms.

Hunter *et al.* (1997) fand unter den häufigsten Tumorhistologien keine Überrepräsentierung des langsamen *NAT2*-Genotyp (duktale Mammakarzinome: n=332, OR: 1,0, 95%VB: 0,7-1,3; lobuläre Mammakarzinome: n=42, OR: 1,1, 95%VB: 0,6-2,0; invasive Mammakarzinome: n=391, OR: 1,0, 95%VB: 0,7-1,3; In-situ-Karzinome: n=73, OR: 0,9, 95%VB: 0,5-1,4). In dieser Studie wurde allerdings die Assoziation zwischen dem schnellen *NAT2*-Genotyp und unterschiedlichen Tumorhistologien des Mammakarzinoms nicht untersucht.

In der weiteren jüngeren Literatur (Ambrosone *et al.* 1996; Millikan *et al.* 1998; Huang *et al.* 1999) finden sich keine Hinweise auf diese auffällige Korrelation.

Die Bedeutung dieses Zusammenhanges ist derzeit unklar. Die Ergebnisse lassen allenfalls vermuten, dass Unterschiede in der Ätiopathogenese des invasiv-lobulären Mammakarzinoms und des invasiv-duktales Mammakarzinom bestehen.

4.3. Assoziationen des schnellen *NAT2*-Genotyps mit dem Hormonrezeptorstatus bei Mammakarzinomen.

Es fiel auf, dass unter den Hormonrezeptor-positiven Fällen mit Mammakarzinom der schnelle *NAT2*-Genotyp signifikant häufiger vertreten war als unter den Hormonrezeptor-negativen Fällen. Der langsame Acetylierergenotyp kam dagegen unter den Hormonrezeptor-negativen Fällen erheblich häufiger vor. Darüberhinaus imponierte die geringe Anzahl der schnellen Acetylierer unter den Hormonrezeptor-negativen Fällen.

Der Befund ist bemerkenswert, da im Falle einer Bestätigung dieses Ergebnisses durch statistisch aussagekräftige Fallzahlen davon auszugehen wäre, dass der schnelle *NAT2*-Genotyp mit positivem Hormonrezeptorstatus im Vergleich zum langsamen *NAT2*-Genotyp ein erhöhtes Risiko hätte, an einem Mammakarzinom zu erkranken.

Aus der Literatur findet sich hierzu nur ein Hinweis in der phänotypischen Studie von Philip *et al.* 1987 (Testsubstanz: Dapson), der keine Korrelation zwischen dem phänotypischen Acetyliererstatus und dem Hormonrezeptorstatus beobachtete.

Die Studien aus den letzten 5 Jahren, die in erster Linie das Problem beleuchten, ob und inwieweit der *NAT2*-Genotyp die potentiell karzinogenen Effekte des Zigarettenrauchens modifiziert, enthalten keine Hinweise auf die mögliche Korrelation zwischen *NAT2*-Genotyp und Hormonrezeptorstatus.

Dieser Befund der Korrelation zwischen Hormonrezeptor-positiven Fällen eines Mammakarzinoms mit dem schnellen *NAT2*-Genotyp weist möglicherweise auf Besonderheiten im Pathomechanismus bei der Entstehung des Mammakarzinoms hin, der derzeit unklar ist.

4.4. Assoziationen des schnellen *NAT2*-Genotyps mit Zigarettenkonsum

Nach dem Ergebnis vorliegender Untersuchung konnte in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen eine leichte Zunahme der Schnell-Acetylierer mit steigendem Zigarettenkonsum (PJ) beobachtet werden. Dieser Befund erlangte jedoch keine statistische Signifikanz. Menge und Dauer des Zigarettenkonsums erhöhten weder bei den schnellen noch bei den langsamen Acetylierergenotypen signifikant das Brustkrebsrisiko.

Dieses Ergebnis kommt den Befunden nahe, die in den Studien von Hunter *et al.* 1997 und Millikan *et al.* 1998 erhoben wurden, nicht jedoch den Beobachtungen aus den Untersuchungen von Ambrosone *et al.* 1996.

Auch Hunter *et al.* 1997 fanden eine nichtsignifikante Risikoerhöhung unter den Mammakarzinompatientinnen mit einem schnellen Acetylierertyp, die mehr als 5 Jahre vor der ersten ausgetragenen Schwangerschaft geraucht hatten (RR=1,5; 95%-CI 0,9-2,6).

Ebenso fanden Millikan *et al.* 1998, dass bei prämenopausalen Frauen vom schnellen Acetylierertyp der Verdacht auf ein zunehmendes Brustkrebsrisiko bestand, jedoch waren die Tests für die Trendanalyse nicht signifikant.

Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse aus der Untersuchung von Ambrosone *et al.* (1996), wonach das Zigarettenrauchen signifikant das Brustkrebsrisiko bei postmenopausalen Frauen vom langsamen Acetylierertyp erhöht. Der langsame *NAT2*-Genotyp verstärkt danach die Suszeptibilität für die Effekte des Zigarettenrauchens und damit das Brustkrebsrisiko. Dagegen fanden sich keine Hinweise auf ein erhöhtes Brustkrebsrisiko durch Zigarettenrauchen bei prämenopausalen Frauen.

Die Untersuchungen von Ambrosone *et al.* 1996 zeigten darüberhinaus, dass unter den Frauen vom langsamen Acetylierertyp sowohl aktuelles wie auch früheres Zigarettenrauchen Dosis-abhängig signifikant das Brustkrebsrisiko erhöhten.

Unter den Frauen mit einem schnellen Acetylierertyp stellte das Zigarettenrauchen dagegen keinen erhöhten Risikofaktor dar.

Wurde der *NAT2*-Genotyp nicht berücksichtigt, war eine Assoziation zwischen Zigarettenrauchen und Brustkrebs nach Ambrosone *et al.* 1996 nicht feststellbar.

Bereits 1995 hatten Ambrosone *et al.* unter dem Gesichtspunkt, dass der *NAT2*-Genotyp die Effekte des Zigarettenkonsums inbezug auf die Entstehung des Mammakarzinom modifizieren kann, beobachtet, dass der langsame *NAT2*-Genotyp Frauen für die karzinogenen Effekte des Zigarettenrauchens in einem besonderen Mass sensibilisiert. Dagegen kam der Interaktion zwischen Zigarettenrauchen und schnellem *NAT2*-Genotyp als Risikofaktor für ein Mammakarzinom in dieser Untersuchung keine Bedeutung zu.

Hunter *et al.* konnten 1997 die Ergebnisse Ambrosones *et al.* in einer Nachfolgestudie, wie oben bereits angedeutet, nicht bestätigen. Dies trifft auch für die Gruppe postmenopausaler Mammakarzinompatientinnen (n=706) vom langsamen *NAT2*-Genotyp zu, die zum Zeitpunkt der Tumordiagnose oder noch kurz zuvor geraucht hatten.

Im Vergleich mit Nichtrauchern vom schnellen Acetylierertyp fand sich für die genannte Gruppe zwar der Nachweis eines Trends zur Risikoerhöhung jedoch nicht der Hinweis auf einen signifikanten Unterschied.

Millikan *et al.* 1998 gelangten zu dem gleichen Ergebnis, das zeigte, dass bei postmenopausalen Frauen vom langsamen Acetylierertyp lediglich der Trend zu einer nicht-signifikanten Risikoerhöhung für ein Mammakarzinom durch eine zunehmende Anzahl von gerauchten Zigaretten bestand.

Darüberhinaus fanden Millikan *et al.*, dass unabhängig vom *NAT2*-Genotyp und unabhängig vom Menopausenstatus lediglich eine mässige aber nicht-signifikante Risikoerhöhung in Abhängigkeit von der Dauer des Nikotinkonsums (insbesondere > 20 Jahre) feststellbar war.

In der grössten, von Baron *et al.* (1996) vorgelegten Fall-Kontroll-Studie fand sich keine Korrelation zwischen gegenwärtigem Zigarettenrauchen und Mammakarzinom-Risiko. Dagegen wurde ein leicht erhöhtes Risiko für Zigarettenrauchen in der Vergangenheit beschrieben.

In einer anderen 1996 von Morabia *et al.* vorgelegten Fall-Kontroll-Studie waren Informationen über die Exposition von Nichtrauchern gegenüber Zigarettenrauch in der Umgebung enthalten.

Nach Ausschluss der Frauen mit einer Exposition gegenüber Zigarettenrauch in der Umgebung (zu Hause, am Arbeitsplatz, während der Freizeit) beobachteten die Autoren eine strenge positive Korrelation zwischen aktivem Zigarettenrauchen bei Frauen, die aktuell und in der Vergangenheit rauchten, und Brustkrebsrisiko.

Dabei nahm das Risiko mit der Anzahl gerauchter Zigaretten zu. Ein erhöhtes Brustkrebsrisiko wurde auch bei Patientinnen beobachtet, die als Nichtraucherinnen gegenüber Zigarettenrauch in der Umgebung exponiert waren.

In der vorliegenden Studie waren anamnestische Daten zur Exposition von Nichtraucherinnen gegenüber Zigarettenrauch in der Umgebung nicht erhoben worden, so dass die von Morabia erhobenen Befunde nicht kommentiert werden können.

4.5. Stratifizierungen innerhalb des Mammakarzinomkollektivs

Die Stratifizierung nach Untergruppen zeigte, dass keine signifikante Interaktion zwischen Alter, prä- und postmenopausalen Fällen, Menstruationsdauer ($>/< 35$ Jahre), Tumorgrading und Tumorstadium mit dem schnellen *NAT2*-Genotyp zu erkennen war.

Hunter *et al.* (1997) beobachteten ebenfalls das Fehlen einer signifikanten Interaktion zwischen dem *NAT2*-Acetyliererstatus und etablierten Risikofaktoren wie: Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Tumordiagnose, Body-Mass-Index (BMI), Alter zum Zeitpunkt der Menopause, Alter bei der ersten Geburt, Alter zum Zeitpunkt der Menarche, familiäre Belastung durch ein Mammakarzinom der Mutter und/oder der Schwester, Anamnese einer vorbestehenden benignen Brusterkrankung.

Danach erscheint es unwahrscheinlich, dass dem *NAT2*-Genotyp in Verbindung mit bekannten Risikofaktoren für das Mammakarzinom eine modifizierende Bedeutung zukommt.

4.6. Toxifizierung von Fremdstoffen zu Karzinogenen in der Ätiopathogenese des Mammakarzinoms

Unterschiedliche endogene und exogene Faktoren werden für die Entstehung des Mammakarzinoms als Ursache in Betracht gezogen. Es liegen Hinweise vor, dass dem Zigarettenrauchen eine wichtige Bedeutung zukommt. Dabei werden die im Zigarettenrauch enthaltenen aromatischen Amine (Arylamine) als Karzinogene für das Brustkrebsrisiko verantwortlich gemacht.

Der Weg zum ultimativen Karzinogen beruht auf dem Zusammenwirken verschiedener Enzymsysteme (Abb. 4; Hein *et al.* 1993).

Nach Aufnahme in den Organismus durchlaufen die Arylamine als Präkanzerogene unterschiedliche, miteinander konkurrierende Reaktionen, die zur Entgiftung oder Giftung der Substanzen führen.

Sie können primär durch die *NAT1/NAT2* *N*-acetyliert werden. Dies stellt den Detoxifizierungsprozess dar.

Nachfolgend können die Substanzen durch Cytochrom P-450 1A2 (CYP1A2) zu Arylhydroxamsäure *N*-oxidiert werden (Detoxifikation) oder erst mit Hilfe des CYP1A2 *N*-oxidiert und danach mittels NAT1/ NAT2 zu Acetoxyestern- *O*-acetyliert werden (Toxifikation).

Bei den Acetoxyestern handelt es sich um instabile Verbindungen, aus denen sich durch Wasserabspaltung hochreaktive Arylnitreniumionen bilden. Diese elektrophilen Intermediärprodukte reagieren mit nukleophilen Gruppen der DNA und entfalten so ihre genotoxischen Wirkungen. Durch Zelltransformation kommt es zur Tumorentstehung (Maier *et al.* 1990).

Auch aromatische Kohlenwasserstoffe werden nach Resorption durch die Schleimhaut durch oben genannte Enzymsysteme in ihre Epoxidform überführt, in der sie mit DNA- und RNA-Molekülen interagieren können.

Aromatische Kohlenwasserstoffe sind ausserdem in der Lage, CYP1A2 durch Enzyminduktion erheblich in seiner Aktivität zu steigern, wodurch vermehrt Zwischenprodukte für die *O*-Acetylierung anfallen, die zu hochreaktiven Arylnitreniumionen führen.

Betrachtet man die Funktion der NAT2 als Katalysator für verschiedene Reaktionen auf dem Weg zu ultimativen Karzinogenen, lässt sich leicht verdeutlichen, welche Folgen eine genetisch bedingte Aktivitätssteigerung des Enzyms bewirken kann.

Laborversuche haben gezeigt, dass aromatische Amine Mutagene des Brustdrüsengewebes darstellen, die bei Hunden und bei Menschen eine karzinogene Wirkung entfalten können (King *et al.* 1979, Tonelli *et al.* 1979, Shirai *et al.* 1981; Allaben *et al.* 1982, Allaben *et al.* 1983, Wang *et al.* 1988, Eldridge *et al.* 1994, Swaminathan *et al.* 1994).

Karzinogene im Zigarettenrauch gelangen in direkten Kontakt mit dem Epithel des Mammagewebes. In Flüssigkeitsaspiraten aus Brustwarzen von Raucherinnen wurden Metaboliten von Inhaltsstoffen aus dem Zigarettenrauch nachgewiesen (Petrakis *et al.* 1978). Diese Flüssigkeitsaspirate besitzen darüberhinaus mutagene Eigenschaften (Petrakis *et al.* 1980).

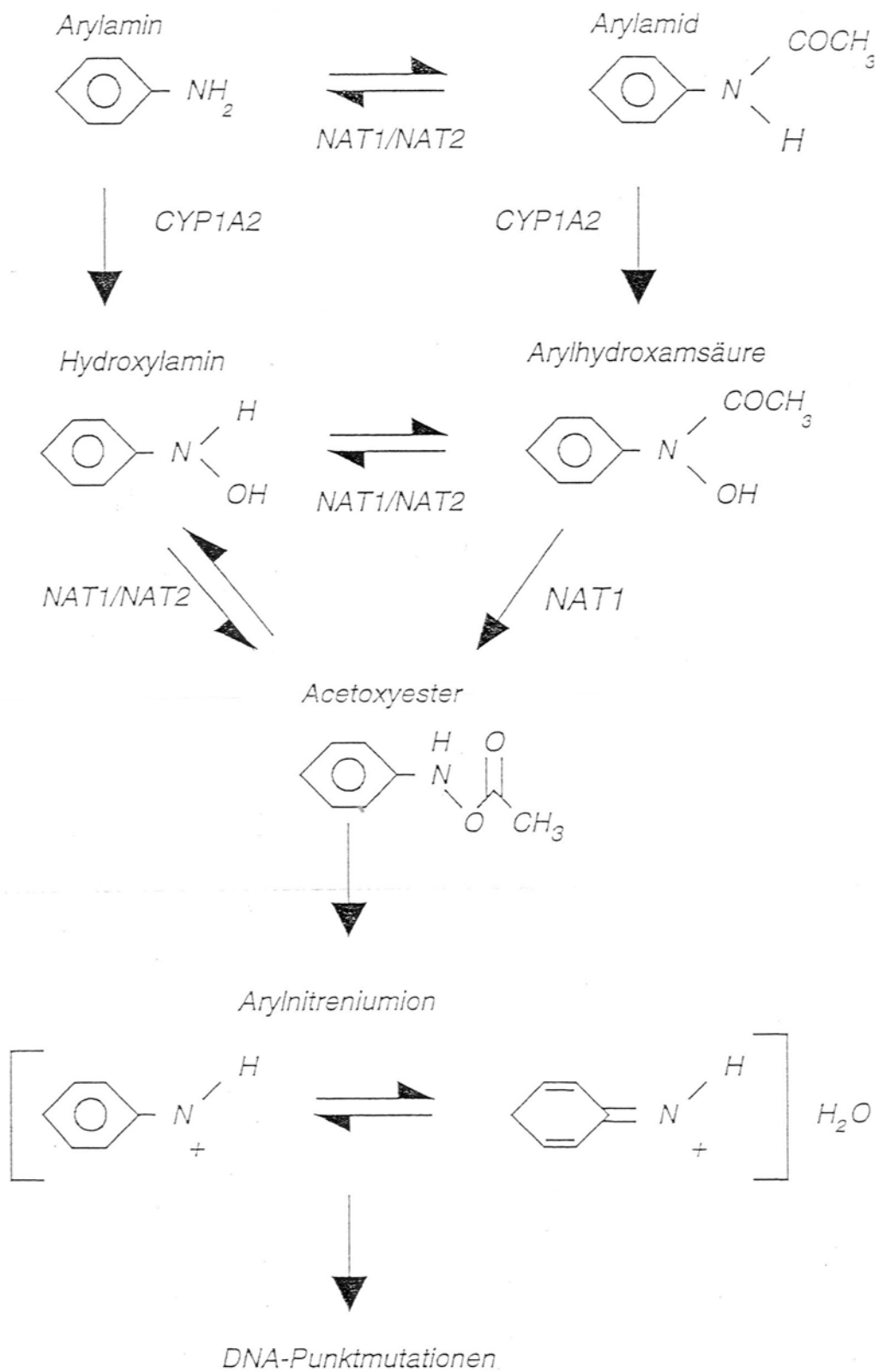


Abb. 5: Metabolisierungswege von Arylaminen (nach Hein *et al.*, 1993)

Es wurden auch mit dem Zigarettenrauch in Verbindung stehende DNA-Addukte im menschlichen Brustgewebe identifiziert (Perera *et al.* 1995; Li *et al.* 1996). Die im Zigarettenrauch enthaltenen aromatischen Amine wie das 4-Aminobiphenyl und das α -Naphthylamin sind als Mutagene und Karzinogene zu betrachten, da sie durch den Metabolismus aktiviert werden. Aromatische Amine können ebenso nachweislich Strukturschäden der DNA im menschlichen Brustdrüsengewebe auslösen (Swaminathan *et al.* 1994, Eldridge *et al.* 1994). Sie können Epithelzellen von Mäusemammarien aus Kulturen maligne transformieren (Tonelli *et al.* 1979), und sie sind in der Lage, maligne Mammatumore bei Labortieren zu induzieren (Shirai *et al.* 1981; Allaben *et al.* 1982).

Aromatische Amine können, wie gezeigt wurde, bei Hunden karzinogen auf das Brustdrüsengewebe wirken, wenn sie unter experimentellen Bedingungen in der Leber der Tiere aktiviert werden (Shirai *et al.* 1981). Es wurde deshalb diskutiert, ob der langsame Acetylierer-Genotyp, der über eine geringere Kapazität zur Detoxifizierung aromatischer Amine verfügt, auch höhere Konzentrationen reaktiver Intermediate aufweist. Im Brustdrüsengewebe vollzieht sich wahrscheinlich die weitere Aktivierung mit der Folge, dass promutagene, karzinogene DNA-Addukte entstehen, die die endgültige Karzinogenese einleiten (Sadrieh *et al.* 1996; Josephy *et al.* 1996).

Aromatische Amine werden bioaktiviert und/oder entgiftet durch Enzyme des Fremdstoffwechsels. Zu diesen Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen werden das Cytochrom P4501A2 (CYP1A2) und die *N*-Acetyltransferasen (NAT1 und NAT2) gerechnet.

Die *N*-Acetylierung von aromatischen Aminen durch die NAT2 ist ein Schritt der Detoxifikation, der durch die hepatischen *NAT*-Enzyme katalysiert wird. Dieser Stoffwechselweg konkurriert mit dem für die *N*-Oxidation durch CYP1A2. Hierdurch können reaktive *N*-OH-Metabolite in die Blutzirkulation eintreten, werden dabei weiter aktiviert und können im Zielgewebe an DNA-Strukturen binden.

Es wurde die Vermutung geäußert, die Aktivität der NAT1 im Brustgewebe überträfe die der NAT2. Die Bedeutung aber, die der Funktion der hepatischen Detoxifikation zukommt, sollte nicht unterschätzt werden (Ambrosone *et al.* 1996).

Die Rolle, die aromatische Amine bei der Karzinogenese des Mammakarzinoms spielen, kann der bei Harnblasenkarzinomen analog sein. Zigarettenrauchen stellt einen Risikofaktor für das Harnblasenkarzinom dar. Menschen mit einem langsamen *NAT2*-Genotyp weisen höhere Spiegel der 4-Aminobiphenyl-Hämoglobin-Addukte auf. Dies deutet darauf hin, dass die Clearance von reaktiven Arylamin-Metaboliten herabgesetzt ist (Ambrosone *et al.* 1996).

5. Zusammenfassung

Die Bedeutung des Polymorphismus des NAT-Genotyps als eines eigenständigen Risikofaktors in der Ätiopathogenese des Mammakarzinoms ist derzeit Gegenstand kontroverser Diskussionen.

In dieser Studie sollte die Häufigkeit hereditärer Polymorphismen an den Genorten der NAT2 im Vergleich mit einer altersgematchten Kontrollgruppe untersucht werden.

Dies sollte zum einen die Frage nach einer möglichen Überrepräsentierung des Langsam- oder Schnell-Acetylierers bei Mammakarzinompatientinnen beantworten.

Zum anderen sollte überprüft werden, ob der NAT-Genotyp das Tumorrisiko bei Frauen mit bekannten Risikofaktoren (Menopausenstatus, Dauer der Menstruation, Alter) erhöht. Auch die Assoziation zwischen NAT-Genotyp und Nikotinabusus wurde dabei untersucht, sowie die Assoziation mit Blutgruppenmerkmalen.

Schliesslich sollte überprüft werden, ob der NAT-Genotyp mit bestimmten Merkmalen des Mammakarzinoms (Hormonrezeptorstatus, Grading, TNM-Stadium, Histologie) korreliert ist, d.h. es sollte untersucht werden, inwieweit ein bestimmter NAT-Genotyp modulierenden Einfluss auf die besondere Ausprägung bestimmter Tumormerkmale besitzt.

In Übereinstimmung mit der jüngeren Literatur (Ambrosone *et al.* 1996, Hunter *et al.* 1997 und Millikan *et al.* 1998; Huang *et al.* 1999) zeigte vorliegende Studie, dass eine signifikante Überrepräsentierung eines bestimmten NAT2-Genotyps beim Mammakarzinom nicht zu beobachten war.

Sie zeigte, dass der NAT2-Genotyp keinen unabhängigen Suszeptibilitätsfaktor in der Ätiopathogenese des Mammakarzinoms darstellt. Lediglich ein Trend zu einem leichten Überwiegen der schnellen Acetylierer bei Mammakarzinomfällen im Vergleich mit den nicht Tumor-erkrankten Kontrollen war erkennbar.

Auffallende Befunde dieser Arbeit stellen die nachweisliche Assoziation zwischen Tumorphistologie und Hormonrezeptorstatus einerseits und dem *NAT2*-Genotyp andererseits dar.

Danach prädisponiert der schnelle *NAT2*-Genotyp Frauen zu einem Mammakarzinom mit invasiv-lobulärer Histologie und mit positiven Hormonrezeptorstatus. Diese Befunde wiesen am ehesten auf Besonderheiten im Pathomechanismus der Karzinogenese des Brustkrebses hin, die weiterer Abklärung bedürfen.

In Verbindung mit dem zusätzlichen Risikofaktor Zigarettenrauchen war eine leichte Zunahme der Schnell-Acetylierer mit steigendem Zigarettenkonsum (PY) zu beobachten. Diese Assoziation war jedoch ohne statistische Signifikanz.

Auffallend war die hohe Frequenz der Schnell-Acetylierer bei Trägern der Blutgruppe B (n=21). Hierzu fehlen Vorbefunde aus der Literatur. Eine Wertung dieses Befundes erscheint schwierig.

Mit Rücksicht auf die in den letzten 5 Jahren sämtlich prospektiv durchgeführten, genotypischen Studien mit grossen Fallzahlen besteht ein überwiegender Konsens darüber, dass dem Polymorphismus des *NAT*-Genotyps als einem unabhängigen Risikofaktor in der Entstehung des Mammakarzinoms keine mit den beim Brustkrebs bekannten Risikofaktoren vergleichbare Bedeutung zukommt.

Literaturverzeichnis

Adami H O, Lund E, Bergstrom R, Meirik O. Cigarette smoking, alcohol consumption and risk of breast cancer in young women. *Br. J Cancer*. **58**:832-837 (1988).

Adami H, Bergstrom R, Lund E, *et al.* Absence of association between reproductive variables and the risk of breast cancer in young women in Sweden and Norway. *Br J Cancer*. **62**:122 (1990)

Agundez J A G., Ladero J M, Olivera M. Genetic Analysis of the Arylamine *N*-Acetyltransferase Polymorphism in Breast Cancer Patients. *Oncology*. **52**:7-11 (1995).

Agundez J A G, Olivera M, Martinez C, Ladero J M, Benitez J. Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human NAT2 gen in a white population. *Pharmacogenetics*. **6**:109-140 (1996).

Allaben W T, Weeks C E, Weis C E, Burger G T, King C M. Rat mammary gland carcinogenesis after local injection of *N*-hydroxy-*N*-acyl-2-aminofluorenes: relationship to metabolic activation. *Carcinogenesis*. **3**:233-240 (1982).

Allaben W T, Weis C C, Fullerton N F, Beland F A. Formation and persistence of DNA adducts from the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene in rat mammary gland in vivo. *Carcinogenesis*. **4**:1067-1070 (1983).

Ambrosone C B, Freudenheim Jo L, Graham S: Cigarette Smoking, *N*-Acetyltransferase 2 Genetic Polymorphisms, and Breast Cancer Risk. *JAMA*. **Vol.276 No.18**:1494-1501 (1996).

Ambrosone CB, Freudenheim Jo L, Sinha R, Graham S, Marshall J R, Vena J E, Laughlin R, Nemoto T, Shields P G. Breast Cancer Risk, Meat Consumption And *N*-Acetyltransferase (NAT2) Genetic Polymorphism. *Int. J. Cancer*. **75**:825-830 (1998).

Anderson D. Genetic study of breast cancer: identification of a high risk group. *Cancer*. **34**:1090 (1974)

Baron J, Newcomb P, Longnecker M, Mittendorf R, Storer B, Clapp R, Bogdan G; Yuen G. Cigarette smoking and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **5**:399-405 (1996).

Baron JA, Byers T, Greenberg ER, Cummings KM, Swanson M. Cigarette smoking in women with cancers of the breast and reproductive organs. *J Natl Cancer Inst.* **77**:677-680 (1986)

Bell D A, Taylor J A, Butler M A, Stephens E A, Wiest J, Brubaker L H, Kadlubar F F, Lucier G W. Genotype/phenotype discordance for human arylamine *N*-Acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-Acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis*. **14**: 1689-1692 (1993).

Bernstein L, Ross R, Lobo R. The effects of moderate physical activity on menstrual cycle patterns in adolescence: implications for breast cancer prevention. *Br J Cancer.* **55**:681 (1987).

Blum M, Grant M D M, McBride W, Heim M, Meyer U A, Human arylamine *N*-Acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization and functional expression. *DNA Cell Biol.* **9**:193-203 (1990)

Blum M, Demierre A, Grant M D M, Heim M, Meyer U A. Molecular mechanism of slow Acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:5237-5241 (1991).

Bluman LG, Rimer BK, Berry DA, *et al.* Attitudes, knowledge and risk perceptions of women with breast and ovarian cancer considering testing for BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol.* **17**:1040 (1999).

Bouchardy C, Mitrunen K, Wikman H. *N*-Acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes and lung cancer risk. *Pharmacogenetics*. **Vol 8**:291-298 (1998).

Brinton I, Hoover R, Fraumeni J. Reproductive factors in aetiology of breast cancer. *Br J Cancer.* **47**:757 (1983)

Brinton L A, Schairer C, Stanford J L, Hoover R N. Cigarette smoking and breast cancer. *Am J Epidemiol.* **123**:614-622 (1986)

Brockmöller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphism in arylamine *N*-Acetyltransferase 2, glutathione S-transferase M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk: *Cancer Res.* **56**: 3915-3925 (1996).

Brownson R C, Blackwell C W, Pearson D K, Reynolds R D, Richens J W Jr, Papermaster B W. Risk of breast cancer in relation to cigarette smoking. *Arch Intern Med.* **148**:140-144 (1988)

Buell P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J Natl Cancer Inst.* **51**:1479-1483 (1973).

Bulovskaya, L N, Kriplein R G, Bochina T A, Shipkova A A, Pavlova M V. Acetylator phenotype in patients with breast cancer. *Oncology* **35**:185-188 (1978)

Capstur S, Potter J, Sellers T, *et al.* Increased risk of breast cancer with alcoholic consumption in postmenopausal women. *Am J Epidemiol.* **136**:1221 (1992)

Capstur S, Morrow M, Sellers T. Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology: results of the Iowa Womens' Health Study. *JAMA.* **281**:2091 (1999).

Cascorbi I, Drakoulis N, Bockmöller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine-*N*-Acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasians individuals: correlation with Phenotypic Activity. *Am. J. Hum. Genet.* **57**:581-592 (1995).

Cascorbi I, Bockmöller J, Mrozokiewicz P M, Bauer S, Loddenkemper R, Roots I. Homozygous Rapid Arylamine *N*-Acetyltransferase (NAT2) Genotypes as Susceptibility Factors for Lung Cancer. *Cancer Res.* **56**:3961-3966 (1996).

Cascorbi I, Brockmöller J, Bauer S, Reum T, Roots I. *NAT2*12A* (803A->G) codes for rapid arylamine *N*-acetylation in humans. *Pharmacogenetics*. **6**:257-259 (1996).

Cascorbi I, Bockmöller J, Müller A, Roots I. Arylamine-*N*-Acetyltransferase activity in man. *Drug Metabol. Rev.* **31**:489-507 (1999).

Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, *et al.* Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with high risk for breast cancer. *Ann Intern Med.* **130**:270 (1999).

Chu S Y, Stroup N E, Wingo P A, Lee N C, Peterson H B, Gwinn M L. Cigarette smoking and the risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.* **131**:244-253 (1990).

Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WE, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer.* **77**:2318 (1996).

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalyses of data from 51 epidemiological studies of 52.705 women with breast cancer and 108.411 women without breast cancer. *Lancet.* **350**:1047 (1997).

Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T. Correlation between Acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine *N*-Acetyltransferase in human liver. *J. Biol. Chem.* **265**: 12757-12760 (1990)

Delomenie C, Sica D, Grant D M, Krishnamoorthy R, and Dupret J M. *Pharmacogenetics*. **6**:177-185 (1996).

De Vita T, Hellman S, Rosenberg S A (Hrsg.): *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Fifth Edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia (2001).

Doll R, Gray R, Hafner B, Peto R. Mortality in relation to smoking: 22 years' observation on female British doctors. *BMJ.* **280**:967-971 (1980)

Drodz M, Giereck T, Jendryczko A, Pilch J, Piekarska J. *N*-Acetyltransferase phenotype of patients with cancer of the larynx. *Neoplasma* **34**:481-483 (1987).

Dunning A M, Healey C S, Pharoah P D , Teare MD, Ponder B A, Bruce A J. Easton D F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* **Vol. 8**:843-854 (1999).

Dupont W, Page D. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med.* **312**:146 (1985).

Dupont W, Page D, Parl F, *et al.* Estrogen replacement therapy in women with a history of proliferative breast disease. *Cancer.* **85**:1277 (1999).

Eldridge S R, Gould M N, Butterworth B E. Genotoxicity of enviromental agents in human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **52**:5617-5621 (1994).

Evans D A P, Eze L C, Whibley E J. The associaton of the slow Acetylator phenotype with bladder cancer. *J. Med. Genet.* **20**:330-333 (1993).

Evans D A P. *N*-Acetyltransferase. In: Kalow, W. (Hrsg.): *Pharmacogenetics of drug metabolism*. Pergamon Press, New Yorck. 95-178 (1992).

Ewartz M. Smoking and breast cancer risk in Denmark. *Cancer Causes Controll.* **1**:31-37 (1990)

Field N A, Baptiste M S, Nasca P C, Metzger B B. Cigarette smoking and breast cancer. *Int J Epidemiol.* **21**:842-848 (1992)

Fretland, A.J., Leff, M.A., Doll, M.A., and Hein, D.W. Functional characterization of human *N*-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenetics*, **11**: 207-215, 2001.

Friedenreich C, Howe G, Miller A, *et al.* A cohort study of alcolhol consumption and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.* **137**:512 (1993).

Garfinkel L, Bofetta P, Stellman S. Alcohol and breast cancer: a cohort study. *Prev.* **17**:686 (1988)

Gil J P, Lechner M C. Increased frequency of wild-type arylamine-*N*-Acetyltransferase allele *NAT2*4* homozygotes in Portuguese patients with colorectal cancer. *Carcinogenesis*. **19**:37-41 (1998).

Grant D M, Mörike K, Eichelbaum M, Meyer U A. Acetylation pharmacogenetics: The slow Acetylator phenotype is caused by decreased or absent arylamine *N*-Acetyltransferase in human liver. *J. Clin. Invest.* **85**:968-972 (1990).

Grant D M, Blum M, Demierre A, Meyer U A. Polymorphisms of *N*-Acetyltransferase genes. *Xenobiotica.*, **Vol.22, Nos 9/10**:1073-1081 (1992).

Grant D M: Molecular genetics of the *N*-Acetyltransferases. *Pharmacogenetics*. **3**:45-50 (1993)

Greiling H; Gressner AM. *Lehrbuch der Klinischen Chemie*. S. 564. Schattauer (1995).

Hadjimichael O, Boyle C, Meigs J. Abortion before first live birth and risk of breast cancer. *Br J Cancer*. **53**:283 (1986).

Hankinson S, Willet W, Manson J, *et al.* Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* **87**:1297 (1994).

Hankinson S, Colditz G, Manson J, *et al.* A prospective study of oral contraceptive use and risk of breast cancer (Nurses' Health Study, United States). *Cancer Causes Control*. **8**:65 (1997).

Hankinson S, Willet WC, Manson J, *et al.* Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* **90**:1292 (1998).

Hancock SL, Tucker MA, Hoppe RT. Breast cancer after treatment of Hodgkin's disease. *JNCI*. **85**(1):25-31 (1993).

Healey B. BRCA-genes bookmaking, fortune telling, and medical care. *N Engl J Med*. **336**:1448-1449 (1997).

Hein D W, Doll M, Rustan T, Gray K, Feng Y, Ferguson R, Grant D. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 Acetyltransferases. *Carcinogenesis (Lond.)*. **14**: 1633-1638 (1993)

Hein D W, Ferguson R J, Doll M, Rustan T, Gray K. Molecular genetics of human polymorphic *N*-Acetyltransferase - enzymatic analyses of 15 recombinant wild-type, mutant and chimeric NAT2 alloenzymes. *Hum. Molec. Genetics*. **3**:729-734 (1994)

Hein, DW, Grant, DM, and Sim, E. Update on consensus arylamine *N*-acetyltransferase gene nomenclature. *Pharmacogenetics*, **10**:291-292, (2000).

Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol*. **2**:343 (1995).

Henderson B, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res*. **48**:246 (1988)

Henderson B, Ross R, Ludd H. Do regulate ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer*. **45**:1206 (1985)

Henning S, Cascorbi I, Münchow B, Jahnke V, Roots I. Association of arylamine *N*-acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes to laryngeal cancer risk. *Pharmacogenetics*. **9**:103-111 (1999).

Hiatt R A, Fireman B H. Smoking, menopause, and breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. **76**:833-838 (1986)

Hiatt R A, Klatzky A L, Armstrong M A. Alcoholic consumption and the risk of breast cancer in a pre-paid health plan. *Cancer Res.* **48**:2284-2287 (1988)

Hickman D, Sim E. *N*-Acetyltransferase polymorphism - comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem. Pharmacol.* **42**:1007-1014 (1991).

Hickman D, Risch A, Buckle V, Spurr N K, Jeremiah S J, McCarthy A, Sim E. Chromosomal localisation of human genes for arylamine *N*-Acetyltransferase. *Biochem J.* **297**: 441-445 (1994).

Hildreth N, Shore L, Dvoretzky P. The risk of breast cancer after irradiation of the thymus in infancy. *N Engl J Med.* **321**:146 (1989)

Hoecksema MJ, Law C. Cancer mortality rates fall: a turning point for the nation. *JNCI* **88(23)**:1706-1707 (1996).

Howe H, Senie R, Bzsuch H, *et al.* Early abortion and breast cancer risk in women under 40. *Int J Epidemiol.* **18**:300 (1989)

Holmes M, Hunter D, Coldtz G, *et al.* Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *JAMA.* **281**:914 (1999).

Huang Z, Hankinson SE, Golditz GA, *et al.* Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA.* **278**:1407 (1997).

Huang, C-S, Chern H-D, Shen C-Y, Hsu S-M, Chang K-J. Association between *N*-Acetyltransferase (*NAT2*) genetic polymorphism and developement of breast cancer in postmenopausal chinese women in Taiwan, an area of great increase in breast cancer incidence. *Int. J. Cancer.* **82**:175-179 (1999).

Hunter D J, Hankison S E, Hough H. A prospective study of *NAT2* Acetylation genotype, cigarette smoking, and risk of breast cancer. *Carcinogenesis.* **Vol.18, No.11**: 2127-2132 (1997).

Hunter D, Spiegelman D, Adami H, *et al.* Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer. A pooled analysis. *N Engl J Med.* **334**:356 (1996)

Hunter D, Willet W C. Nutrition and breast cancer. *Cancer causes Control.* **7**:56-68 (1996).

Huober J, Bertram B, Petru E. Metabolism of debrisoquine and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* **Vol. 18**:43-48. (1991).

Ilett K F, Ingram D M, Carpenter D S, Teitel C H, Lang A P, Kadlupar F F. Expression of monomorphic and polymorphic *N*-Acetyltransferases in human colon. *Biochem. Pharmacol.* **47**:914-917 (1994).

Jarvinen R, Knekt P, Seppanen R , Teppo L. Diet and breast cancer risk in a cohort of Finnish women. *Cancer Lett.* **114**:251-253 (1997).

Joseph P D. The role of peroxidase-catalyzed activation of aromatic amines in breast cancer. *Mutagenesis.* **11**:3-7 (1996).

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* **15**:233 (1993).

King C M, Traub N R, Lortz Z M, Thissen M R. Metabolic activation of arylhydroxamine acids by *N*-O-acetyltransferase of rat mammary gland. *Cancer Res.* **39**:3369-3372 (1979).

Kinlen L. Meat and fat consumption and cancer mortality: a study of strict religious orders in Britain. *Lancet.* **1**:946 (1982)

Ladero R M, Benitez J, Jara C. Polymorphic Oxidation of Debrisoquine in Women with Breast Cancer. *Oncology.* **48**:107-110 (1991).

Ladero R M, Fernandez M J, Palmeiro R. Hepatic Acetylator Polymorphism in Breast Cancer Patients. *Oncology.* **44**:341-344 (1987).

Lerman C, Lustbader E, Rimer B, *et al.* Effects of individualized breast cancer risk counseling: a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* **87**:286 (1995).

Levi F, Vecchia C, Luccini F *et al.*. Cancer mortality in Europe. 1990-1992. *Eur. J. Cancer Prev.* **4**:389-417 (1995).

Li D, Wang M, Dhingra K, Hittleman W M. Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to breast cancer etiology. *Cancer Res.* **56**:287-293 (1996).

Lin H J, Han C Y, Lin B K, Hardy S. Slow Acetylators mutations in the human polymorphic *N*-Acetyltransferase gene in 786 Asians, blacks, Hispanics and whites - application to metabolic epidemiology: *Am. J. Hum. Genet.* **52**:827-834 (1993).

Lin H J. Smokers and breast cancer: "chemical individuality" and cancer predisposition. *J. Am. Med. Ass.* **276**:1511-1512 (1996)

London S J, Colditz G A, Stampfer M J, Willet W C, Rosner B A, Speizer F E. Prospective study of smoking and the risk of breast cancer. *J Natl. Cancer Inst.* **81**:1625-1631 (1989)

Longnecker M, Berlin J, Orza M. A meta-analysis of alcohol consumption in relation to breast cancer risk. *JAMA.* **260**:642 (1988)

Lower G M, Nilsson T, Nelson C E, Wolf H, Gamsky T E, Bryan G T. *N*-Acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer. Approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark: *Environ. Health Perspect.* **29**:71-79. (1979)

MacMahon B, Cole P, Lin T. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull WHO.* **43**:209 (1970)

MacMahon B, Cole P, Brown J. Etiology of human breast cancer: a review. *J Natl Cancer Inst.* **50**:21 (1973)

MacMahon B, Trichopoulos D, Brouwn J. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer risk. *Int J Cancer*. **29**:12 (1982)

McMichael A, Giles G. Cancer in migrants to Australia: extending descriptive epidemiological data. *Cancer Res*. **48**:751 (1988).

Madigan M P, Ziegler R G, Benichou J, Byrne C, Hoover R N: Proportion of breast cancer cases in the Unites States explained by well established risk factors. *J.Nat..Cancer Inst*. **87**:1681-1685 (1995).

Maier H, Dietz A, Zielinski D, Jünemann K H, Heller W D. Risikofaktoren bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx. *Dtsch. med. Wschr*. **115**:843-850 (1990)

Maier H, Dietz A, Gewelke U Seitz H K, Heller W D. Tabak- und alkoholassoziertes Krebsrisiko im Bereich des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes. *Laryngo-Rhino-Otol*. **69**:505-511 (1990)

Malone K, Daling J, Weiss N. Oral contraceptives in relation to breast cancer. *Epidemiol Rev*. **15**:80 (1993)

Martinez C, Agundez J A G, Olivera M, Martin R, Ladero J M, Benitez J. Lung cancer and mutations at the polymorphic NAT2 gene locus. *Pharmacogenetics*. **5**:207-214 (1995).

Meara J, McPherson K, Roberts M, Jones L, Vessey M. Alcohol, cigarette smoking and breast cancer. *Br J Cancer*. **60**:70-73 (1989)

Millikan R C, Pittman G S, Newman B. Cigarette Smoking, *N*-Acetyltransferase 1 and 2, and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **Vol. 7**:371-378 (1998).

Miller A; Howe G, Sherman G. Mortality from breast cancer after irradiation during thorascopic examinations in patients being treated for tuberculosis. *N. Engl J Med.* **321**: 1285 (1989).

Molgavkar S, Day N, Stevens R. Two stage model for carcinogenesis: epidemiology of breast cancer in females. *J Natl Cancer Inst.* **54**:559 (1989)

Mommsen, S.; Barfold, N M, Aagaard, J. *N*-Acetyltransferase phenotypes in the urinary bladder carcinogenesis of a low-risk population: *Carcinogenesis.* **6**:199-201 (1985).

Morabia A; Bernstein M; Heritier S; Khatachatnan N. Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. *Am. J. Epidemiol.* **143**:918-928 (1996).

Mrozikiewicz P M, Cascorbi I, Brockmöller J, Roots I: Determination and allelic allocation of seven nucleotide transitions within the arylamine *N*-acetyltransferase gene in the Polish population. *Clin Pharmacol Ther.* 59:376-382 (1996).

Madigan M P, Ziegler R G, Benichou J, Byrne C, Hoover R N. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well established risk factors. *J. Nat. Cancer Inst.* **87**:1681-1685 (1995).

Melbye M, Wohlfahrt J, Olsen J. Induced abortion and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* **336**:81 (1997)

Morabia A, Bernstein M, Heritier S, Khatchatanan N. Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. *Am. J. Epidemiol.* **143**:918-928 (1996)

Nebert D. Polymorphisms in drug-metabolism enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am. J. Hum. Gen.* **60**:265-271 (1997)

Newcomb P, Storer B, Longnecker M, *et al.* Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med.* **330**:81 (1994)

Newcomb P, Storer B, Longnecker M, *et al.* Pregnancy termination in relation to risk of breast cancer. JAMA.. **275**:283 (1996).

Nissen-Meyer R. Primary breast cancer: the effect of primary ovarian irradiation. Ann Oncol. **2**:343 (1991).

O'Connel DL, Hulka BS, Chambles LE, Wilkinson WE, Deubner DC. Cigarette smoking, alcohol consumption, and breast cancer risk. J Natl Cancer Inst. **78**:229-234 (1987).

Ottman R, King M, Pike M, *et al.* Practical guide to estimating risk in familial breast cancer. Lancet. **2**:556 (1983).

Palmer JR, Rosenberg L, Clarke E, *et al.* Breast cancer and cigarette smoking: a hypothesis. Am J Epidemiol. **134**:1-13 (1991)

Perera FP, Estabrook A, Hewer A, *et al.* Carcinogenic DNA-adducts in human breast tissue. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **4**:233-238 (1995).

Petrakis NL, Gruenke LD, Beelen TC, Castagnoli N Jr, Craig JC. Nicotine in breast fluid of nonlactating women. Science. **199**:303-304 (1978)

Petrakis NL, Maack CA, Lee RR, Lyon M. Mutagenic activity in nipple aspirates of human breast fluid. Cancer Res. **40**:188-189 (1980)

Philip PA, Rogers HJ, Millis, RR. Acetylase Status and its Relationship to Breast Cancer and Other Diseases of the Breast. Eur. J. Cancer Clin Oncol. **Vol.23. No.11**:1701-1706 (1987).

Philips R, Gafinkel L, Kuzma J. Mortality among California Seventh Day Adventists for selected cancer sites. J Natl Cancer Inst. **65**: 1097 (1980)

Phillips KA, Glendon G, Knight J. Putting the risk of breast cancer in perspective. N Engl J Med. **340**: 141.

Pike M, Henderson B, Casacrande J. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *Br J Cancer*. **43**:720 (1983)

Brind J, Chinchilli V, Severs W, Summy-Long J. Induced abortion as an independent risk factor for breast cancer. A comprehensive review and meta-analysis. *J Epidemiol Comm Health*. **50**:481 (1996).

Rich-Edwards J, Goldman M, Willolet W, et al. Adolescent body mass index and ovulatory infertility. *Am J Obstet Gynecol*. **171**:171 (1994).

Rebbeck TR, Levin AM, Eisen A, *et al*. Breast cancer risk after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. **91**:1475 (1999).

Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, *et al.*, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996. Bethesda, MD; National Cancer Institute, 1999

Risch A, Wallace DMA, Bathers S, and Sim E. Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum. Mol. Genet*. **4**:231-236 (1995).

Roberts-Thomson I C, Ryan P, Khoo K K, Hart W J, McMichael A J, Butler R N. Diet, Acetylator phenotype and risk of colorectal neoplasia. *Lancet*. **374**:1372-1374 (1996).

Rockhill B, Willet W, Hunter D, *et al*. A prospective study of recreational physical activity and breast cancer risk. *Arch Intern Med*. **159**:2290 (1999).

Rohan TE, Baron JA. Cigarette smoking and breast cancer. *Am J Epidemiol*. **129**:36-42 (1989) .

Romieu I, Berlin J, Colditz G. Oral contraceptives and breast cancer: review and meta-analysis. *Cancer*. **66**:2253 (1990)

Roots I, Drakulis N, Ploch M, Heynemeyer G, Loddenkemper R, Minks T, Nitz M, Otte F, Koch M: Debrisoquine hydroxylation phenotype, Acetylation phenotype, and ABO blood groups as genetic host factors of lung cancer risk. *Klin. Wochenschr.* **66**:87-97 (1988).

Roots I, Drakulis N, Brockmöller J. Polymorphic enzymes and cancer risk: concepts, methodology and data review. In Kalow, W.: *Pharmacogenetics of drug metabolism*. Pergamon, New York. 815-841 (1992).

Rosenberg L, Palmer J, Kaufman D, *et al.* Breast cancer in relation to the occurrence and time of the induced and spontaneous abortion. *Am J Epidemiol.* **127**:981 (1988)

Ross R, Paganini-Hill A, Wan P, Pike M. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst.* **16**:328 (2000).

Sadrieh N, Davis CD, Synderwine EG. *N*-Acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived heterocyclic amines in the human mammary gland. *Cancer Res.* **56**: 2683-2687 (1996).

Salber EJ, Trichopoulos D, MacMahon B. Lactation and reproductive histories of breast cancer patients in Boston. *J Natl Cancer Inst.* **43**:1013-1024 (1969)

Salmon R, Ansquer Y, Asselain B, *et al.* Clinical and biological characteristics of breast cancers in postmenopausal women receiving hormone replacement therapy for menopause. *Oncol Rep.* **65**:699 (1999).

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2nd ed. 13.1.-13.104 (1989).

Schairer C, Lubin J, Troisi R, *et al.* Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA.* **283**:485 (2000).

Schatzkin A, Carter CL, Green SB, *et al.* Is alcohol consumption related to breast cancer? results from the Framingham Heart Study. *J Natl Cancer Inst.* **81**:31-35 (1989)

Schechter MT, Miller AB, Howe GR, Baines CJ, Craib KJ, Wall C. Cigarette smoking and breast cancer: case control studies of prevalent and incident cancer in the Canadian National Breast Breast Screening Study. *Am J Epidemiol.* **130**:230-220 (1989)

Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K (Hrsg.). *Kompendium Internistische Onkologie.* Springer, 3. Auflage (1999).

Schöps W, Prior V, Golka K, Blaszkewicz M, Cascorbi I, Roots I, Bolt H M, Kierfeld G. Untersuchung zur klinischen Relevanz der Acetylierephänotypisierung bei 196 Urothel-tumorpatienten. *Urologe* **36**:64-67 (1997).

Shirai T, Fysh FM, Lee M-S, Vaught JB, King CM. Relationship of metabolic activation of *N*-hydroxy-*N*-acylarylamines to biological response in the liver and mammary gland of the female CD rat. *Cancer Res.* **41**: 4346-4353 (1981).

Sillero-Arenas M, Delgado-Rodriguez M, Rodigues-Canteras R, *et al.* Menopausal hormone replacement therapy and breast cancer: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* **79**:286 (1992)

Steinberg K, Thacker S, Smith S, *et al.* A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *JAMA.* **265**:1985 (1991)

Stockwell H G, Lyman G H. Cigarette smoking and the risk of female reproductive cancers. *Am J Obstet Gynecol.* **157**: 35-40 (1987)

Swaminathan S, Frederickson S M, Hatcher J F. Metabolic activation of *N*-hydroxy-4-Acetyl-aminobiphenyl by cultured human breast epithelial cell line MCF 10A. *Carcinogenesis.* **15**:611-617 (1994)

Thomas D. Oral contraceptives and breast cancer: review of the epidemiologic literature. *Contraception.* **43**:597 (1991)

Thune I, Brenn T, Lund E, Gaard M. Physical activity and the risk of breast cancer. *N Engl Med.* **336**:1269 (1997).

Tokunada M, Land C, Yamamoto T, *et al.* Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki. *Radiat. Res.* **112**: 243 (1987).

Tonelli QJ, Custer RP, Sorof S. Transformation of cultured mouse mammary glands by aromatic amines and amides and their derivatives. *Cancer Res.* **39**:1784-1792 (1979)

Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* **48**:605 (1972)

Trichopoulos D, Hsieh C, MacMahon B. Age at first birth and breast cancer risk. *Int J Cancer.* **31**:701 (1983)

Trichopoulos D, Yen S, Brown J. The effect of westernization of urine estrogens, frequency of ovulations, and breast cancer risk. *Cancer.* **53**:187 (1984)

Vatsis K P, Martell K J, Weber W W. Diverse point mutations in the human gene for polymorphic *N*-Acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **88**:6333-6337 (1991)

Vatsis K P, Weber W W, Bell D A, Dupret J M, Evans D A P, Grant D M, Hein D W, Lin H J, Meyer U A, Relling M V, Sim E, Suzuki T, Yamazoe Y. Nomenclature for *N*-Acetyltransferases. *Pharmacogenetics.* **5**:1017 (1995).

Vatten L J, Kvinnsland S. Cigarette smoking and risk of breast cancer: a prospective study of 24,329 Norwegian women. *Eur J Cancer.* **26**: 830-833 (1990).

Vessey M, Baron J, Doll R, Mc Pherson K, Yeates D. Oral contraceptives and breast cancer: final report of an epidemiological study. *Br J Cancer.* **47**:455-462 (1983)

Webster D J T, Flook D, Jenkins J, Hutchings A, Routledge P A. Drug acetylation in breast cancer. *Br. J. Cancer.* **60**:236-237 (1989).

Willet W, Stampfer M, Golditz G. Dietary fat and risk of breast cancer. *N Engl J Med.* **16**:22 (1987)

Wang C Y, Yamada H, Morton K C, Zukowsky K, Lee M-S, King C M. Induction of re-pair synthesis of DNA in mammary and urinary bladder epithelial cells by *N*-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines. *Cancer Res.* **48**:4227-4232 (1988).

Wingo P, Lee N, Ory H, *et al.* Age specific differences in the relationship between oral contraceptive use and breast cancer. *Obstet Gynecol.* **78**:161 (1991)

Yuan J, Yu M, Ross R, *et al.* Risk factors for breast cancer in Chinese women in Shanghai. *Cancer Res.* **48**:1949 (1988)

Ziegler R, Hoover R, Nomura A, *et al.* Relative Weight, weight change, height, and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* **88**:650 (1996).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der Charite angefertigt. Ich danke Herrn Prof. Roots sehr für die Überlassung des Themas und die günstigen Arbeitsbedingungen an seinem Institut.

Herrn Dr. K-H. Röhl, 1995 Chefarzt der Abteilung Hämatologie-Onkologie der Rehabilitationsklinik Bavaria Kreische, danke ich für die Anregung zur Beschäftigung mit der grundsätzlichen Frage nach dem Zusammenhang zwischen individuellem Metabolisierstatus und der Entstehung von Karzinomen.

Herrn Dr. B. Orth danke ich für die Möglichkeit der Patientenakquisition in der Abteilung Hämatologie-Onkologie der Rehabilitations-Klinik Bavaria Kreische.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Krüger für die Möglichkeit der Patientenakquisition in der Abteilung Hämatologie-Onkologie der Rehabilitationsklinik Bavaria Freyung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi, der in grosszügiger Weise die Fertigstellung der Arbeit förderte.

Frau H. Maszynski danke ich für die freundliche Beratung als Gast im genetischen Labor.

Lebenslauf

21.12.1951	Als Sohn von Waldtraut Wolf (geb. Löffler) und des Diplom Chemikers Dr. Rudolf Wolf geboren
1958 – 1962	Besuch der Grundschule in Darmstadt (Mornewegschule)
1962 – 1970	Besuch des neusprachlichen Georg-Büchner Gymnasiums in Darmstadt mit Abitur
1970 – 1971	Studium der Medizin an der Universität Frankfurt (2 Semester)
1971 – 1975	Studium der Philosophie mit Staatsexamen (Universität Freiburg)
1971 – 1976	Studium der Germanistik mit Staatsexamen (Universität Freiburg)
1976 – 1978	Studium der Anglistik mit Staatsexamen (Universität Freiburg)
1979	Unterrichtstätigkeit an einer Realschule bei Darmstadt (Pfaffenberg-schule Mühlthal)
1980 – 1981	Bemühung um Wiederaufnahme des Medizinstudiums
1981 – 1987	Studium der Medizin an der Universität zu Köln mit Staatsexamen
1987 – 1994	Weiterbildung zum Facharzt Innere Medizin (Klinikum Darmstadt)
01/95 – 12/97	Oberarzt in der Abteilung Onkologie der Rehabilitationsklinik „Klinik Bavaria Kreische“
04/95	Anerkennung als Facharzt für Innere Medizin
seit 01/98	Oberarzt in der Abteilung Neurologie der Rehabilitationsklinik „Asklepios Klinik Schaufling“ (vormals „Klinik Bavaria“)

gez.:

Reinhard Wolf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter von mir verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Hengersberg im November 2002

Reinhard Wolf